



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTICOLINESTERÁSICAS DE  
*PTYCHOPETALUM OLACOIDES* E SUA RELEVÂNCIA EM UM MODELO ANIMAL  
DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

TESE DE DOUTORADO

**Micheli Figueiró**

Porto Alegre  
2010



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTICOLINESTERÁSICAS DE  
*PTYCHOPETALUM OLACOIDES* E SUA RELEVÂNCIA EM UM MODELO ANIMAL  
DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Micheli Figueiró**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elaine Elisabetsky**

**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Porto Alegre  
2010

“Enquanto o cérebro for um mistério, o Universo continuará a ser um mistério”.

**(Santiago Ramón y Cajal)**

“Fórmula para o sucesso:  $A=X+Y+Z$ , onde A é sucesso, X é trabalho, Y é lazer e Z é boca fechada.”

**(Albert Einstein)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos meus pais, Jair e Adriana, meus grandes incentivadores e financiadores por terem deixado seguir meus sonhos até tornarem-se conquistas. A minha querida irmã, Tati, sempre preocupada com meu bem-estar, pelo incentivo e por me fazer sorrir!! Ao meu irmão Thiago, um grande lutador, que sempre teve orgulho de mim. Agradeço a vocês pela compreensão nos momentos de ausência (que foram muitos) e pelo apoio incondicional. Terei vocês sempre no meu coração.

Ao meu fã número 1, obrigada pela imensa admiração, orgulho, incentivo, carinho...tens um lugar especial no meu coração!

À minha ORIENTADORA ELAINE ELISABETSKY (sim, ela merece que seja em letras maiúsculas) por ter me aceitado, apostado e confiado no meu trabalho. Também sou grata pelo conhecimento compartilhado, que contribuiu muito para meu crescimento e pelo imenso apoio que recebi em dois dos momentos mais difíceis da minha vida. E claro, pelos bons momentos de descontração que tivemos nas nossas inúmeras reuniões. Obrigada, obrigada e obrigada. Foi uma honra ter podido conviver com uma pessoa como a senhora.

À professora Matilde, essa graça de pessoa! O que dizer? Obrigada por me fazer deixar de temê-la e passar a adorá-la. Sou extremamente grata por ter aberto seu laboratório para que eu explorasse o encantador mundo da histologia e pelo conhecimento que adquiri. Sou sua fã!

À Lisi, mais do que uma co-orientadora, uma amiga. Agradeço pelo apoio e incentivo para fazer sempre mais uma experiência! Sempre tem um anticorpo na manga!! Tem sede pelos resultados e um jeito todo seu de fazer ciência. Vou levar um pouquinho disso comigo. Obrigada por tudo.

A minha amiga Dani, que me ensinou muito de cinética enzimática e que torce por mim incondicionalmente. Obrigada pelos ensinamentos, pelas gargalhadas, trapalhadas e pela amizade sincera que criamos.

A um colega e amigo simplesmente fantástico: o Joce. Sem sua ajuda e seus ensinamentos eu não seria nada. Muito do que sei aprendi contigo. Obrigada por sempre estar disposto a transformar meus experimentos em nossos. Pela alegria e vontade com que sempre trabalhou. O mundo que se prepare, ganhará um excelente neurocientista.

Às minhas colegas e amigas do laboratório de Etnofarmacologia, Vivi, Adri e Ana em especial, pelos bons momentos e pela ajuda sempre que precisei. Obrigada, vocês são extraordinárias. Vou levá-las no meu coração.

Aos queridos amigos e colegas do laboratório de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, Marcelo, Bina, Paulo, Ana, que fizeram me sentir em casa na Bioquímica e imploravam pelos meus seminários!!!!

Às ICs, Camila e Marília, sempre dispostas a me ajudar.

Aos professores do PPG-Neurociências, pelos ensinamentos (que não foram poucos) que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiii</b>
<b><i>ABSTRACT</i></b>	<b>xiv</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Envelhecimento e Demência	1
1.2. Doença de Alzheimer	2
1.2.1. Características Histopatológicas	5
1.3. Sistema Colinérgico e a DA	10
1.3.1. Colinesterases	11
1.3.1.1. Estrutura e inibição da AChE	12
1.4. Farmacoterapia da DA	13
1.4.1. IChEs como agentes terapêuticos	15
1.5. Desenvolvimento de drogas para o tratamento de déficits cognitivos	17
1.6. Plantas medicinais: breve histórico	21
1.7. <i>Ptychopetalum olacoides</i> : etnofarmacologia e perfil psicofarmacológico	22
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivos Gerais	27
2.2. Objetivos Específicos	27

**3. RESULTADOS****29****3.1. Artigos Científicos****29**

3.1.1. Inhibitory effects of an Amazonian herbal on acetylcholinesterase isoforms in mouse hippocampus, striatum and frontal cortex. 30

3.1.2. Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal. 50

3.1.3. The Amazonian herbal Marapuama attenuates  $\beta$ -amyloid (1-42)-induced memory impairment and neurodegeneration in mice. 58

**4. DISCUSSÃO****82****5. CONCLUSÕES****91****6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS****93**

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

**Introdução**

Figura 1 - Secção coronal *postmortem* do encéfalo de um indivíduo idoso saudável (à esquerda) comparado com o de um paciente com DA (à direita). 6

Figura 2 - **(A)** Placa senil (corada com anticorpo monoclonal para peptídeo  $\beta$ -amilóide humano usando DAB e hematoxilina); **(B)** Distribuição das placas senis no encéfalo; **(C)** Emaranhado neurofibrilar – NFTs (corado com prata) do encéfalo de paciente com DA e **(D)** Distribuição dos emaranhados neurofibrilares no encéfalo. 8

Figura 3 - *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) 24

**Artigos Científicos****Artigo 3.1.1.**

Figura 1. Effect of POEE and eserine on G1 (a) and G4 (b) AChE isoforms in mouse hippocampus. 45

Figura 2. Effect of POEE and eserine on G1 (a) and G4 (b) AChE isoforms in mouse frontal cortex. 46

Figura 3. Effect of POEE and eserine on G1 (a) and G4 (b) AChE isoforms in mouse striatum. 47

Figura 4. Lineweaver–Burk representation of G1 AChE (a) and G4 AChE (b) inhibition by POEE in the hippocampus with acetylthiocholine as substrate. 48



Tabela 1. Effect of POEE on $K_m$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) and $V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol ATC/h/mg protein}$ ) of hippocampus G1 and G4 AChE.	ix 49
---	----------

### **Artigo 3.1.2.**

Figura 1. Effects of POEE on AChE activity in mouse hippocampus CA1 (A), CA3 (B) and striatum (C).	52
Figura 2. Representative images of the AChE staining intensity in areas of brain from mice treated with saline, galanthamine, DMSO and POEE.	53
Figura 3. Effect of POEE <i>ex vivo</i> on G1 (A) and G4 (B) AChE isoforms in mouse hippocampus.	54
Figura 4. Effect of POEE <i>ex vivo</i> on G1 (A) and G4 (B) AChE isoforms in mouse frontal cortex.	54
Figura 5. Effect of POEE <i>ex vivo</i> on G1 (A) and G4 (B) AChE isoforms in mouse striatum.	55
Figure 6. Western blotting analysis of AChE immunocontent in synaptosomal fractions from the mouse hippocampus (A) and frontal cortex (B).	55

### **Artigo 3.1.3.**

Figura 1. Effects of POEE on $A\beta_{1-42}$ -induced long term memory impairment in the step-down inhibitory avoidance test in mice.	80
Figura 2. Effects of POEE on BDNF levels in hippocampus of $A\beta_{1-42}$ -treated mice.	81
Figura 3. Effects of POEE on $A\beta_{1-42}$ -amyloid deposits in mouse hippocampus.	82
Figura 4. Effects of POEE on GFAP expression in hippocampus from $A\beta_{1-42}$ -treated mice.	83

Figura 5. Effects of POEE on neuronal loss in CA1 hippocampus (pyramidal layer) <sup>x</sup>  
84  
from A $\beta$ <sub>1-42</sub>-treated mice.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>NFTs</b>	Neurofibrillary Tangles
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>FHP</b>	filamentos helicoidais pareados
<b>A<math>\beta</math></b>	beta-amilóide
<b>APP</b>	proteína precursora amilóide
<b>ICHes</b>	inibidores de colinesterase
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>ChEs</b>	colinesterases
<b>AChE</b>	acetilcolinesterase
<b>BuChE</b>	butirilcolinesterase
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>CCL</b>	comprometimento cognitivo leve
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>ChAT</b>	colina acetil transferase
<b>CHT</b>	transportador de colina
<b>VAcHT</b>	transportador de acetilcolina vesicular
<b>mAChR</b>	receptor muscarínico de acetilcolina
<b>nAChR</b>	receptor nicotínico de acetilcolina
<b>SNP</b>	sistema nervoso periférico

<b>EGb 761</b>	extrato de <i>Ginkgo biloba</i>
<b>HupA</b>	huperzina A
<b>PO</b>	<i>Ptychopetalum olacoides</i>
<b>EEPO</b>	extrato etanólico de <i>Ptychopetalum olacoides</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentração de inibidor necessária para inibir metade da atividade enzimática
<b>K<sub>m</sub></b>	constante de Michaelis-Menten (concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é metade da velocidade máxima)
<b>V<sub>máx</sub></b>	velocidade máxima
<b>CA1</b>	cornio de Amon 1
<b>CA3</b>	cornio de Amon 3
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor
<b>GFAP</b>	glial fibrillary acidic protein
<b>i.c.v.</b>	intracerebroventricular

## RESUMO

EEPO é um extrato etanólico padronizado de *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae), uma planta medicinal popularmente conhecida como Marapuama e utilizada na região amazônica. O uso tradicional e popular de Marapuama sugere o potencial de sua utilização para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central. Nosso grupo já demonstrou que o perfil psicofarmacológico do EEPO inclui atividade antioxidante e neuroprotetora, ação anticolinesterásica, promnésica e antiamnésica. Neste estudo mostramos que EEPO apresenta robusta propriedade anticolinesterásica para as isoformas G1 e G4 da AChE, além de aparente seletividade regional para as áreas cerebrais mais relevantes para a cognição. Os parâmetros cinéticos obtidos com ensaios *in vitro* demonstraram que o extrato age como um inibidor competitivo da isoforma G1 e incompetitivo da isoforma G4. Estes resultados mostram que EEPO possui um padrão claramente seletivo de inibição quanto as diferentes isoformas centrais da AChE. A compreensão detalhada da interação de G1 e G4 com EEPO obviamente requer a elucidação estrutural do(s) composto(s) ativo(s). Como contribuição crucial no contexto de desenvolvimento de medicamentos, este estudo forneceu prova conclusiva de que o(s) composto(s) anticolinesterásico(s) presente(s) em uma dose de EEPO efetiva enquanto promnésica é (são) oralmente eficaz(es), atravessam a barreira hematoencefálica e levam à significativa inibição da AChE em áreas cerebrais relevantes para a cognição. Complementando o perfil promnésico/antiamnésico de EEPO, neste estudo verificamos que em um modelo animal da doença de Alzheimer, 14 dias de tratamento com EEPO foi capaz de prevenir o comprometimento da memória induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>, assim como a perda neuronal em CA1, reduzindo ainda os depósitos A $\beta$  e a astrocitose. Assim, embora se saiba que os efeitos promnésicos do EEPO envolvam vários receptores e que sua propriedade anticolinesterásica seja robusta o suficiente para reverter a amnésia induzida por escopolamina, este estudo é o primeiro a fornecer evidências diretas sobre efeito protetor do EEPO contra a amnésia e os sinais de neurodegeneração induzidas pelo A $\beta$ .

**Palavras-chaves:** *Ptychopetalum olacoides*, Alzheimer, anticolinesterásico

## ABSTRACT

EEPO is a standardized ethanol extract of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae), a medicinal plant popularly known as Marapuama and used in the Amazon region. The traditional and popular uses of Marapuama suggest its potential for the treatment of certain central nervous system related diseases. Our research group has shown that the psychopharmacological profile of EEPO includes antioxidant, neuroprotective, anticholinesterase properties as well as promnesic and anti-amnesic effects in mice models. In this study we show that EEPO possess marked anticholinesterase action for the G1 and G4 isoforms of AChE, with an apparent regional selectivity for the brain areas most relevant to cognition. The kinetic parameters obtained with in vitro essays showed that the extract acts as a competitive inhibitor of the isoform G1 and as an uncompetitive inhibitor for the isoform G4. These results show that EEPO has a clear pattern of selective inhibition on the central isoforms of AChE. A detailed understanding of the interaction of G1 and G4 with EEPO obviously requires the structural elucidation of (s) active (s) compound (s). As a crucial contribution in the context of drug development, this study provides a conclusive proof that the anticholinesterase compound(s) present at a dose of EEPO shown to be effective as promnesic is (are) orally effective, do cross the blood brain barrier and lead to significant AChE inhibition in brain areas relevant to cognition. Complementing the promnesic/anti-amnesic profile of EEPO this study found that in an animal model of Alzheimer's disease, 14 days of treatment with EEPO was able to prevent the memory impairment induced by A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide and the neuronal loss in CA1, further reducing A $\beta$  deposits and astrogliosis. Thus, although it is known that the promnesic effects of EEPO involve various receptors and that its anticholinesterase property is robust enough to reverse the amnesia induced by scopolamine, this is the first study to provide direct evidence on the EEPO protective effect against amnesia and signs of neurodegeneration induced by A $\beta$ .

**Key-words:** *Ptychopetalum olacoides*, Alzheimer, anticholinesterasic

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Envelhecimento e Demência

O envelhecimento pode ser visto como um processo complexo, progressivo e universal. Como escreveu recentemente um amigo de minha orientadora: “Family is fine other than the accumulating insults of age”. O aumento da expectativa de vida da população, aliado à drástica redução da taxa de fecundidade registrada nas últimas décadas, tem acarretado um incremento significativo na proporção de indivíduos idosos no Brasil (CHAIMOWICZ, 1998). A proporção de indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos passou de 6% em 1975 para 7,9% em 2000, estimando-se que chegue a 15,4% em 2025 (IZQUIERDO, 2002).

Com o avanço da idade, aumenta a incidência de doenças neurodegenerativas, dentre as quais as que se denominam **demências**. O Dr. Philippe Pinel (1745-1826) foi o primeiro a utilizar a palavra “demência” (*de*: partícula privativa; *mência*: do latim *mens*, mente. Literalmente, “perda da mente”) em 1797. As demências recebem esse nome porque comprometem de forma significativa a memória e também outras funções cognitivas, com intensidade suficiente para produzir perda funcional, eventualmente incluindo a realização de atividades cotidianas ou o reconhecimento de pessoas e lugares do entorno habitual (SQUIRE & KANDEL, 2000).

A demência pode ser decorrente de muitas patologias e é uma das maiores causas de incapacidade no idoso. A prevalência de demência duplica a cada cinco anos após os 60 anos, resultando em aumento exponencial com a idade. Mas de acordo com diferentes estimativas, entre 2 e 10% dos casos iniciam antes dos 65 anos (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2009). Deste grupo, a doença de Parkinson afeta 1% da população mundial (JENNER *et al.*, 1992), enquanto 50 a 75% sofrem com a doença de Alzheimer (DA), uma das formas mais comuns de demência (CHAIMOWICZ, 1998; HERRERA JR. *et al.*, 2002; WORLD ALZHEIMER

REPORT, 2009). As demências vasculares (20-30% dos casos), com corpos de Lewy (<5% dos casos) e frontotemporal (5-10% dos casos), também são comuns (JELLINGER, 2006).

Um dos grandes desafios que a sociedade brasileira enfrentará nas próximas décadas, será portanto acomodar o envelhecimento de sua população, inclusive com a adoção de medidas que possam minimizar a incidência e a gravidade de doenças dessa natureza. Muitos outros quadros patológicos comprometem também a cognição, mas as síndromes resultantes embora demenciais são potencialmente reversíveis, como a depressão severa, o alcoolismo, o hipotireoidismo ou a hidrocefalia. Em muitas ocasiões, o comprometimento vascular secundário à aterosclerose pode constituir um fator determinante ou agravante das disfunções cognitivas dos idosos e/ou das demências (CASSERLY & TOPOL, 2004; WHITMER *et al.*, 2005).

Não se deve confundir a chamada *síndrome amnésica benigna dos idosos* com as demências. A síndrome amnésica benigna resulta provavelmente da diminuição relativa do número total de neurônios e/ou da menor velocidade do fluxo sanguíneo regional cerebral. Expressa-se como leves disfunções na evocação (recordação) de memórias, principalmente recentes (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE & KANDEL, 2000; MESULAM, 2000).

A amnésia benigna aparece também em pessoas jovens ou de meia-idade submetidas a cansaço, estresse, ou simples “nervosismo”. Não é, portanto, característica da idade avançada, nem constitui um sinal de envelhecimento prematuro. Suas causas devem ser procuradas na fisiologia normal da regulação das memórias (IZQUIERDO, 2002; IZQUIERDO *et al.*, 2007).

## **1.2. Doença de Alzheimer**

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza por distúrbio progressivo da memória e de outras funções cognitivas, tais como linguagem,



atenção, funções executivas e habilidades visoespaciais. Os sintomas da DA incluem ainda alterações do humor (depressão), da sensopercepção e julgamento (alucinações e delírios), do comportamento (agitação psicomotora, apatia, agressividade, desinibição), das funções neurovegetativas (insônia, hipersonia, alterações do apetite) e sensitivomotoras (sinais extrapiramidais, mioclonias, reflexos neurológicos primitivos) (CUMMINGS & COLE, 2002; PIMPLIKAR, 2009).

A DA é a causa mais freqüente de declínio cognitivo. A freqüência populacional de uma doença envolve estimativa dos casos já existentes ou antigos (prevalência) e dos casos novos (incidência). A prevalência e a incidência da DA crescem exponencialmente com a idade, a prevalência dobra a cada cinco anos depois dos 65 anos, aumentando de 1% entre os 60 – 65 anos para 40% após os 85 anos (VON STRAUSS *et al.*, 1999).

Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que 5,1 milhões de pessoas apresentem DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2007). No entanto, com o aumento da expectativa de vida e o conseqüente aumento do número de idosos na população, estima-se que a prevalência aumente em cerca de três vezes, podendo chegar a 13,2 milhões de casos apenas nos EUA em 2050 (HEBERT *et al.*, 2003). Dados representativos de países em desenvolvimento são escassos, mas estima-se que cerca de 60% dos pacientes com DA vivam nesses países (BLENNOW *et al.*, 2006). Em 2006, cerca de 26,6 milhões de pessoas em todo o mundo foram acometidas por DA, e esse número pode chegar aos 100 milhões em 2050 (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2007). Os custos, para a saúde pública, do cuidado de pacientes nessa situação não foram ainda rigorosamente estimados no Brasil, mas nos EUA, calcula-se um custo total de 174 mil dólares por paciente/ano (SQUIRE & KANDEL, 2000; HERRERA JR. *et al.*, 2002). Estima-se, também, que os custos diretos e indiretos para a economia americana, decorrentes do cuidado com pacientes com a DA, possam chegar a 100 bilhões de dólares por ano (SQUIRE & KANDEL, 2000; HERRERA JR. *et al.*, 2002) nos

EUA, um valor equivalente ao PIB de muitos países médios.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que entre 1950 e 2025 o número de idosos no Brasil terá aumentado cerca de 15 vezes. Assim, o Brasil será o sexto país quanto ao contingente de idosos em 2025, devendo ter cerca de 32 milhões de pessoas com mais de 60 anos (CERQUEIRA & OLIVEIRA, 2002). Embora no Brasil não tenhamos dados objetivos com respeito à epidemiologia da DA, podemos estimar sua frequência em nosso meio com base em alguns índices. Utilizando dados de outros países, mas tendo como bases estatísticas populacionais brasileiras, estima-se que a prevalência da DA no Brasil seja de 1 milhão e 200 mil pacientes, com a incidência de 100 mil novos casos por ano (GARRIDO & MENEZES, 2002).

Em estudo epidemiológico brasileiro na cidade de Catanduva (SP), em que foram avaliados 1.656 indivíduos com idades acima de 64 anos, demência foi diagnosticada em 118 idosos, correspondendo a uma prevalência de 7,1% (HERRERA JR. *et al.*, 2002). Na faixa etária de 85 anos ou mais, foi diagnosticada demência em 38,9% dos indivíduos. A DA foi a principal causa de demência, responsável por 55,1% dos casos. A prevalência de demência aumentou com a idade e foi maior nas mulheres, além de correlacionar-se inversamente com a escolaridade (3,5% entre pessoas com escolaridade igual ou superior a 8 anos e 12,2% entre os analfabetos). Dados similares foram encontrados em outro estudo de prevalência de demências em um laboratório especializado na cidade de São Paulo, onde num total de 275 pacientes com demência foi verificada uma prevalência de 59,6% de pacientes com DA (TAKADA *et al.*, 2003).

Vários fatores de risco para DA tem sido identificados em estudos epidemiológicos, além da idade e do sexo feminino. Alguns podem estar ligados à redução da capacidade fisiológica cerebral, incluindo redução no tamanho do encéfalo, baixo nível educacional e de habilidades ocupacionais, baixa capacidade mental durante a infância, ou à redução da

atividade mental e física durante a vida adulta (EVANS *et al.*, 1997; MAYEUX, 2003; MORTIMER *et al.*, 2003). Outros estudos apontam para o aumento do risco associado a doenças vasculares, incluindo, hipercolesterolemia, hipertensão, arteriosclerose e doenças coronárias, fumo, obesidade e diabetes (BLENNOW *et al.*, 2006). Outros fatores de risco incluem baixos níveis séricos de folato e vitamina B<sub>12</sub>, elevados níveis plasmáticos e totais de homocisteína, além de histórico familiar de DA ou demência (CLARKE *et al.*, 1998; LAUNER *et al.*, 1999; LUCHSINGER & MAYEUX, 2004).

### 1.2.1. Características Histopatológicas

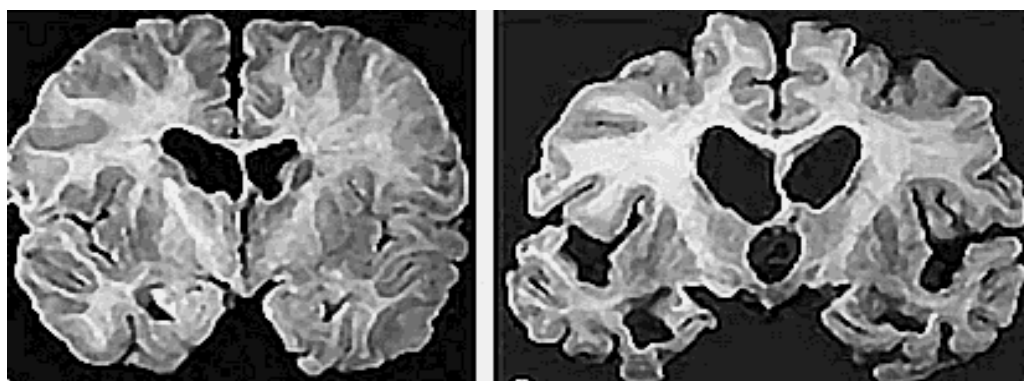
O diagnóstico da DA envolve a combinação dos fatores clínicos associados aos achado anatomo-patológico. Em termos práticos, o diagnóstico só é firmado com base nos critérios clínicos. O diagnóstico definitivo só pode ser obtido com biópsia cerebral no exame *post mortem*, quando as alterações histológicas características da patologia podem ser observadas (HYE *et al.*, 2005).

O exame clínico inclui testes como *Mini-Mental State Examination*, cuja especificidade é considerada boa (96%), mas a sensibilidade é considerada baixa (63%), indicando que o teste pode deixar uma proporção substancial de casos de demência não detectados (CUMMINGS & COLE, 2002).

Os sintomas clínicos iniciais da DA são bastante inespecíficos, incluindo uma discreta redução da memória, freqüentemente acompanhada de alterações de personalidade e apatia. O prejuízo de memória piora gradualmente com o avanço da patologia, levando ao aparecimento de déficits em outras capacidades cognitivas, como julgamento, raciocínio abstrato, cálculos e habilidades visuoespaciais. No estágio intermediário, mais freqüentemente observa-se uma dificuldade para nomear objetos ou escolher a palavra certa para expressar uma idéia

(anomia). Tal processo pode ser progressivo, e em muitos pacientes leva a uma perda total da seqüência lógica da fala (confabulação e prejuízos de construção formal). Nos estágios finais da doença, os pacientes apresentam grande alteração do ciclo sono/vigília e tendem a perambular, tornam-se episodicamente agitados, irritáveis e perdem a capacidade de atender às suas necessidades pessoais. O déficit motor também ocorre nesse estágio podendo incluir rigidez e convulsões.

O exame macroscópico do encéfalo de pacientes de DA revela atrofia cortical em graus variáveis, com redução dos giros corticais, alargamento dos sulcos corticais e dilatação das fissuras silvianas e do sistema ventricular (**Figura 1**). Tais alterações resultam de perda neuronal, sobretudo nas porções mediais dos lobos temporais e no córtex parietal. O exame histológico confirma a ocorrência de perda neuronal, acompanhada de degeneração sináptica e do aparecimento de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Outras inclusões como os corpúsculos de Lewy e de Hirano também são freqüentes (YAARI & COREY-BLOOM, 2007).



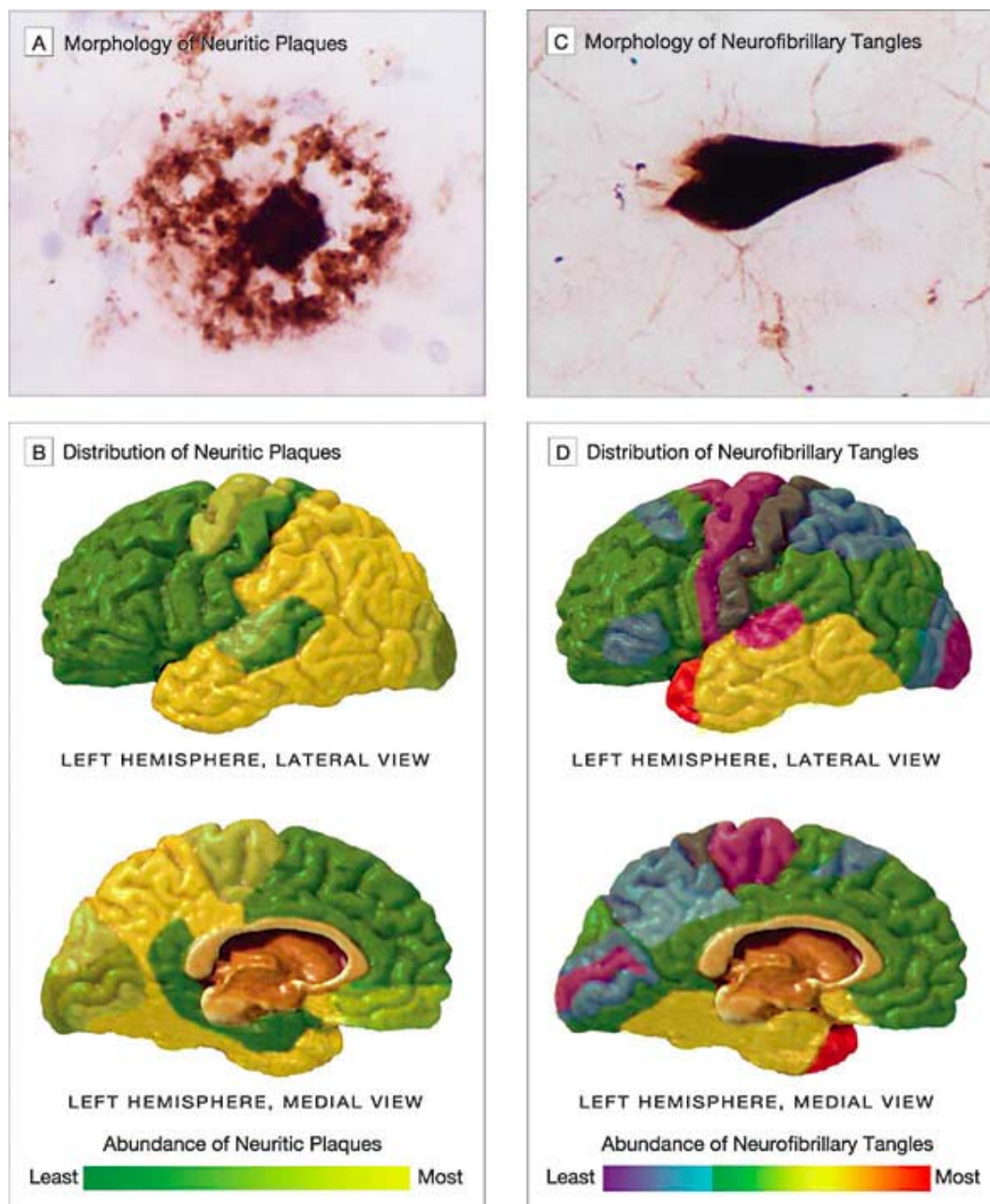
**Figura 1-** Secção coronal *postmortem* do encéfalo de um indivíduo idoso saudável (à esquerda) comparado com o de um paciente com DA (à direita).

FONTE: Yaari & Corey-Bloom, 2007

O processo patogênico da DA em geral tem início nas áreas límbicas do lobo temporal, mais precisamente no hipocampo e no córtex entorrinal (BRAAK *et al.*, 1999). A perda

neuronal ocorre, sobretudo nas camadas piramidais e afeta principalmente as estruturas límbicas e os córtices associativos, com relativa preservação das áreas corticais primárias (motora, somatossensitiva e visual) (HOFFMAN *et al.*, 2000). Paralelamente à perda neuronal, ocorre intensa degeneração sináptica em regiões hipocampais (HEINONEN *et al.*, 1995) e neocorticais (SCHEFF *et al.*, 1993).

As características histopatológicas principais são perdas neuronais em áreas específicas associadas aos emaranhados neurofibrilares (neurofibrillary tangles - NFTs) nos neurônios e a deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide que forma as placas senis (**Figura 2**). Os NFTs e as placas senis podem estar presentes nos encéfalos de indivíduos que apresentam apenas senilidade fisiológica, mas em geral em menor quantidade e com distribuição menos extensa. Acredita-se que o prejuízo cognitivo na DA tenha uma correlação importante com a formação dos NFTs (LOVESTONE & REYNOLDS, 1997; RICHARD & AMOUYEL, 2001).



**Figura 2** – (A) Placa senil (corada com anticorpo monoclonal para peptídio  $\beta$ -amilóide humano usando DAB e hematoxilina); (B) Distribuição das placas senis no encéfalo; (C) Emaranhado neurofibrilar – NFTs (corado com prata) do encéfalo de paciente com DA e (D) Distribuição dos emaranhados neurofibrilares no encéfalo. FONTE: Cummings & Cole, 2002.

De ocorrência intracelular, os NFTs são compostos pelos filamentos helicoidais pareados, cujo constituinte principal é a proteína tau em estado hiperfosforilado. As proteínas tau estabilizam os microtúbulos do citoesqueleto neuronal, atividade que é regulada por

processos de fosforilação e desfosforilação. Evidências sugerem que o aparecimento de tau hiperfosforilada se correlaciona positivamente com o início das alterações cognitivas, reforçando o conceito de que a piora cognitiva tenha uma progressão compatível com o grau de hiperfosforilação desta proteína (SERGEANT, 1997).

As placas senis consistem da deposição extracelular de proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) no parênquima cerebral.  $A\beta$  é um fragmento proteolítico de um precursor maior, a proteína precursora de  $\beta$ -amilóide (APP). As placas de  $A\beta$  são insolúveis, com formas diversas e, conforme o estágio da doença estão presentes em diferentes proporções; todas, no entanto, são capazes de iniciar uma cascata de eventos que podem gerar desde discretas alterações neuríticas até a morte neuronal (DICKSON & VICKERS, 2001). Enquanto crescem as evidências de que o acúmulo de  $A\beta$  é crítico na patogênese da doença (HARDY & SELKOE, 2002), sabe-se que esse acúmulo de não é exclusivamente responsável pelas alterações neuronais que acarretam os sintomas (CARTER & LIPPA, 2001).

A acurácia do diagnóstico por meio de biomarcadores tau-Total e  $A\beta$  no líquido foi investigada em vários estudos. A proteína tau-Total encontra-se aumentada em torno de 300% no líquido de pacientes com DA, provavelmente em função da degeneração neuronal e axonal. Em contraste, a concentração de  $A\beta$  no líquido de pacientes com DA está reduzida em torno de 50%, o que pode estar associado com a excessiva deposição de peptídeos nas placas (BLENNOW *et al.*, 2006). A eficácia do diagnóstico desses marcadores foi validada em casos confirmados neuropatologicamente (SUNDERLAND *et al.*, 2003), mas apesar do grande potencial de aplicação diagnóstico a partir destes biomarcadores ainda não é utilizado, pois sua aplicabilidade na rotina clínica de avaliação de quadros cognitivos requer punção lombar para a coleta de líquido além da falta de padronização quanto a questões metodológicas inerentes aos procedimentos laboratoriais para a dosagem dessas proteínas. Isso dificulta a generalização dos achados e o estabelecimento dos pontos de corte (LEWCZUCK *et al.*,

2006).

### 1.3. Sistema colinérgico e a DA

A DA é uma condição heterogênea com manifestações variadas. A taxa de comprometimento cognitivo, por exemplo, difere acentuadamente entre os indivíduos, assim como as características neuropatológicas. Apesar dessas diferenças, sabe-se que a DA está associada à redução das taxas de ACh no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical. O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias de modulação do SNC desempenhando um papel fundamental em várias funções vitais, como aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral, o que faz deste sistema, alvo de inúmeras pesquisas (MESULAM *et al.*, 2002).

É relevante destacar os principais componentes que constituem o sistema colinérgico: a acetilcolina (ACh); a colina-acetiltransferase (ChAT); o transportador de colina (CHT); o transportador de acetilcolina vesicular (VACHT); os receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) e os nicotínicos (nAChR) e a acetilcolinesterase (AChE) (KAWASHIMA & FUJII, 2003; SARTER & PARIKH, 2005).

A ACh foi a primeira molécula a ser identificada como um neurotransmissor e passou a ser amplamente estudada nas sinapses do SNC e sistema nervoso periférico (SNP). Sua síntese ocorre pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) nas junções neuroefetora e ganglionar a partir do acetil CoA, um produto do metabolismo celular, e da colina, um produto do metabolismo dos lipídeos da dieta (SOREQ & SEIDMAN, 2001; PRADO *et al.*, 2002). Posteriormente, a ACh é transportada até as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular da acetilcolina (VACHT) onde fica armazenada até a sua liberação (RAND, 2007). Com a chegada do potencial de ação a ACh é liberada na fenda sináptica onde exerce seus efeitos mediados pela ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos (RANG



*et al.*, 2004).

A ACh que permanece na fenda sináptica é hidrolisada por uma colinesterase específica produzindo acetato e colina. A colina resultante é em parte recaptada para o terminal pré-sináptico, através de um mecanismo de recaptação de alta afinidade (SOREQ & SEIDMAN, 2001) onde poderá ser reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh (MESULAM *et al.*, 2002).

### **1.3.1. Colinesterases**

A existência de colinesterases que hidrolisam ACh foi estabelecida desde a década de 1930 (LOEWI & NAVRATIL, 1926; STEDMAN & EASSON, 1932).

As duas colinesterases de vertebrados, a acetilcolinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE; E.C.3.1.1.8) são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas, especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÈ *et al.*, 1993). A AChE é predominantemente encontrada no encéfalo (10 vezes mais abundante que a BuChE), junção neuromuscular e eritrócitos (COKUGRAS, 2003). Já a BuChE, é principalmente encontrada no plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita que a AChE (MESULAM *et al.*, 2002). Por seu papel mais proeminente no SNC e na DA, o foco neste trabalho é a acetilcolinesterase.

A AChE é extremamente importante para uma resposta colinérgica satisfatória, já que regula a transmissão do impulso nervoso colinérgico pela rápida hidrólise e inativação da ACh modulando sua concentração nas sinapses (GRISARU *et al.*, 1999; SOREQ & SEIDMAN, 2001). A AChE é uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (MASSOULIÈ *et al.*, 1999). No SNC a secreção de AChE foi encontrada no hipotálamo, substância nigra, estriado, hipocampo, cerebelo e também no fluido cérebro espinhal

(PAXINOS, 1985). Esta enzima é secretada de ambos os terminais axonais dos neurônios, sendo esta taxa de secreção modulada pela estimulação neuronal, pelo nível de neurotransmissor na fenda sináptica, bem como, pelo tratamento com drogas (DESCARRIES, 1997).

Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica, a AChE tem sido implicada em várias ações não-colinérgicas como crescimento dos neuritos (DAY & GREENFIEL, 2002), regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica e osteogênese (CHACÓN *et al.*, 2003), além de atividade hematopoiética em células progenitoras do sangue (SOREQ & SEIDMAN, 2001). A AChE também foi localizada e identificada em linfócitos onde provavelmente tenha um papel importante na regulação de funções imunes (KAWASHIMA & FUJII, 2000). Embora as razões de diferentes perfis farmacológicos dos efeitos de vários agentes anticolinesterásicos não sejam facilmente interpretadas, uma possibilidade aventada é o envolvimento do sítio aniônico periférico ao invés do sítio ativo no papel “não-clássico” da AChE (STERNFELD *et al.*, 1998). Relevante para o contexto deste estudo, há dados que sugerem que a AChE acelera a agregação do peptídeo beta-amilóide, provavelmente através da interação com o sítio periférico (INESTROSA *et al.*, 1998; REYES *et al.*, 1997; BARTOLINI *et al.*, 2003). Embora a relevância destas observações para a patologia da doença de Alzheimer precise ser estabelecida, a associação de AChE com placas amilóides já é conhecida (CARSON *et al.*, 1991), incluindo o fato de que o complexo AChE/A $\beta$  mostra uma neurotoxicidade maior em comparação com fibras contendo apenas A $\beta$  (ALVAREZ *et al.*, 1998).

#### **1.3.1.1. Estrutura e inibição da AChE**

Existem duas classes gerais de formas moleculares da AChE, que diferem quanto à solubilidade, modo de ligação e atividade catalítica: **(1) formas globulares**, que aparecem

como monômeros, dímeros ou tetrâmeros, conhecidas como G1, G2 e G4, contendo uma, duas ou quatro subunidades catalíticas, respectivamente; **(2) formas assimétricas**, onde a ligação de uma cauda de colágeno a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos resulta nas formas estruturais assimétricas A4, A8 e A12, respectivamente (MASSOULIÈ *et al.*, 1993; TAYLOR & BROWN, 1999).

A maioria da AChE encontrada no SNC é do tipo globular, principalmente G1 e G4 (MASSOULIÈ *et al.*, 1993). A isoforma G1 existe apenas na forma solúvel, enquanto a G4 é ligada a membrana (MASSOULIÈ *et al.*, 1999), sendo esta última a mais encontrada em tecido nervoso (DAS *et al.*, 2001; ALDUNATE *et al.*, 2004). Em encéfalos humanos saudáveis, a AChE é responsável por 80% da atividade das colinesterases, estando presente tanto na isoforma G1 quanto na G4, sendo que as proporções de cada uma variam nas diferentes regiões do encéfalo (ATAACK *et al.*, 1986). Em encéfalos de pacientes com DA, há uma redução seletiva de até 90% nos níveis da isoforma G4 ligada a membrana em determinadas regiões, provavelmente devido à perda de terminais pré-sinápticos, enquanto os níveis da isoforma G1 permanecem inalterados (SIEK *et al.*, 1990).

A potência de inibição *ex vivo* de vários IChEs demonstram diferenças significativas entre as regiões do encéfalo. Além disso, a seletividade para diferentes formas moleculares da AChE podem diferir significativamente entre os IChEs. O microambiente do centro ativo da enzima, as propriedades hidrofóbicas das diferentes formas moleculares e a composição lipídica da membrana são fatores que podem determinar a seletividade dos IChEs, podendo ainda encontrarem-se alterados sob condições patológicas (RAKONCZAY, 2003). Por exemplo, a sensibilidade de formas moleculares específicas da AChE à rivastigmina é maior em pacientes com DA do que em indivíduos saudáveis (RAKONCZAY, 2003). No tratamento da DA com IChEs pode ser relevante considerar tanto a forma molecular específica quanto a região cerebral específica da inibição de AChE (ZHAO & TANG, 2002).

#### 1.4. Farmacoterapia da DA

O tratamento farmacológico da DA pode ser definido em quatro níveis: **(1)** terapêutica específica, que tem como objetivo reverter processos patofisiológicos que conduzem à morte neuronal e à demência; **(2)** abordagem profilática, que visa a retardar o início da demência ou prevenir declínio cognitivo adicional, uma vez deflagrado o processo; **(3)** tratamento sintomático, que visa restaurar, ainda que parcial ou provisoriamente, as capacidades cognitivas, as habilidades funcionais e o comportamento dos pacientes portadores de demência; e **(4)** terapêutica complementar, que busca o tratamento das manifestações não-cognitivas da demência, tais como depressão, psicose, agitação psicomotora, agressividade e distúrbio do sono (FORLENZA, 2005). No contexto desta tese, interessa detalhar apenas os inibidores da acetilcolinesterase que à exceção de memantina são a única classe de compostos usados do tratamento sintomático.

A memantina é um antagonista, não-competitivo de baixa afinidade, voltagem-dependente do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), que bloqueia os efeitos patológicos dos níveis elevados do neurotransmissor glutamato que levam a excitotoxicidade (DANYSZ *et al.*, 2000). Essa propriedade deve-se aos efeitos rápidos, voltagem-dependentes, das interações da memantina com os receptores NMDA (MISZTAL *et al.*, 1996). A segurança do uso da memantina foi demonstrada por meio de estudos clínicos controlados por placebo com mais de 500 pacientes portadores de demência leve ou moderada (PANTEV *et al.*, 1993). Nos estudos de fase II, com durações de quatro a seis semanas, concluiu-se que a incidência de reações adversas com a memantina não foi significativamente superior ao placebo; os efeitos colaterais mais comumente relatados foram diarreia, vertigens, cefaléia, insônia, inquietação, excitação e cansaço (JARVIS & FIGGITT, 2003). Quanto à eficácia, doses diárias entre 20 e 30 mg proporcionaram benefícios sobre as funções cognitivas, motoras e comportamentais.

Em pacientes com DA moderada a grave recebendo doses estáveis de IChEs, o tratamento combinado com memantina, além de seguro e bem tolerado (WENK *et al.*, 2000), pode favorecer uma melhora significativa nos parâmetros cognitivos, funcionais e comportamentais, sustentando a indicação do tratamento combinado (TARIOT *et al.*, 2004).

Estudos *post mortem* no início da década de 70 em encéfalos de pacientes com DA encontraram uma redução da captação de colina, na liberação de acetilcolina (ACh) e perda de pericário colinérgico no núcleo basal de Meynert, confirmando um substancial déficit colinérgico pré-sináptico (FRANCIS *et al.*, 1999). Isto resultou na “hipótese do déficit colinérgico” que foi a teoria dominante para DA no início da década de 80. Com esta teoria, muitos sintomas de demência e especialmente dificuldade de aprendizado foram explicados pela falta de ACh. Baseado no pressuposto déficit colinérgico, com a restauração do balanço colinérgico pela inibição do esgotamento de ACh por inibição de sua degradação espera-se conseguir uma melhora cognitiva e talvez uma redução na velocidade de progressão da DA que se julga possa ser consequência da manutenção da atividade neuronal. Em 1993, a FDA aprovou a primeira droga para o tratamento da DA, o IChE tacrina, seguido por outros IChEs: donepezil (1996), rivastigmina (2000) e galantamina (2001).

A disponibilidade de ACh na fenda sináptica depende de duas enzimas: a colina acetiltransferase (enzima de síntese de ACh) e as colinesterases (enzimas de degradação da ACh). As colinesterases consistem de dois grupos: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). Todos os IChEs interferem com a degradação da ACh por bloquearem a AChE e alguns por bloquearem também a BuChE (LANE *et al.*, 2006).

#### **1.4.1. IChEs como agentes terapêuticos**

Os IChEs podem ser classificados com base na reversibilidade e duração da inibição

das ChE. Tacrina, galantamina e donepezil são inibidores reversíveis da AChE, respectivamente de duração curta, intermediária e longa. A inibição da enzima tem duração intermediária para o inibidor pseudo-irreversível (ou lentamente reversível) rivastigmina. Tacrina e rivastigmina inibem também a BuChE, o que pode resultar em maior incidência de efeitos colaterais periféricos; por outro lado, a BuChE também está envolvida na maturação das placas neuríticas, e sua inibição pode representar benefícios adicionais ao tratamento (MESULAM & GEULA, 1994). A importância clínica da inibição da BuChE, não está confirmada.

A resposta aos IChEs é heterogênea, sendo que alguns pacientes beneficiam-se muito, enquanto outros, muito pouco. Estudos controlados por placebo mostram que os benefícios são geralmente observados a partir de 12 a 18 semanas e, possivelmente, desaparecem após seis a oito semanas da interrupção do tratamento (JANN, 1998). Os estudos que avaliaram a eficácia dos IChEs mostraram, de forma consistente, que a sua administração para pacientes com DA leve ou moderada resulta em benefícios discretos, mas significativos em relação aos grupos não-tratados, sobre a cognição, o comportamento e as capacidades funcionais. Dois estudos de metanálise atestam os benefícios sintomáticos dos IChEs em casos de DA (LANCTÔT *et al.*, 2003; ROCKWOOD, 2004) e um atesta que o uso em pacientes com comprometimento cognitivo leve (CCL) pode atenuar o risco de progressão para DA (DINIZ *et al.*, 2009).

Os estudos iniciais com a tacrina documentaram sua eficácia em pacientes com DA e lançaram os alicerces da terapia de reposição colinérgica na DA. Contudo, o uso da tacrina está associado a elevado risco de hepatotoxicidade, observada em 30% a 50% dos casos. A necessidade de monitorização da função hepática, somada a uma difícil posologia (quatro tomadas diárias), fizeram com que a tacrina caísse em desuso.

Os IChEs de segunda geração (donepezil, rivastigmina, galantamina) apresentam

propriedades farmacológicas semelhantes, muito embora algumas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas os diferenciem. Os efeitos clínicos dos IChEs ocorrem em uma janela terapêutica de 30% a 60% de inibição da enzima, promovendo aumento da disponibilidade sináptica de ACh. Tais percentuais são geralmente atingidos nas doses terapêuticas usuais, com eventual piora com níveis mais altos de inibição. Os perfis de efeitos colaterais dessas drogas são também semelhantes, apresentando em geral boa tolerabilidade. Podem acarretar alguns efeitos colaterais, todos resultantes da hiperativação colinérgica periférica, tais como: **(1)** efeitos adversos gastrintestinais: náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, dispepsia, dor abdominal, aumento da secreção ácida; **(2)** cardiovasculares: oscilação da pressão arterial, síncope, arritmia, bradicardia; **(3)** outros sintomas como tonturas, cefaléia, agitação, insônia, câimbras, sudorese, aumento da secreção brônquica.

Em revisão por Cochrane (2006), concluiu-se que os resultados de 10 estudos randomizados, duplo-cego, controlados por placebo, com 6 meses de tratamento com donepezil, galantamina ou rivastigmina na dose recomendada para pacientes com demência leve, moderada ou grave causada pela DA, produz melhoras na função cognitiva e no estado clínico geral. Benefícios do tratamento foram também observados nas avaliações das atividades da vida diária e no comportamento. Nenhum desses efeitos benéficos foi acentuado, e estima-se em 6-12 meses o período de estabilização clínica associada ao uso dos IChEs.

### **1.5. Desenvolvimento de drogas para o tratamento de déficits cognitivos**

Apesar de suas conseqüências devastadoras e de todos os esforços científicos, até o momento, opções farmacoterapêuticas efetivas para a prevenção e tratamento de demências, especialmente a DA, e os sintomas comportamentais e psicológicos associados, ainda não

existem (VAN MARUM, 2008).

A disponibilidade dos IChEs e da memantina pode ser vista como a primeira etapa no tratamento da DA. Os modestos efeitos destas drogas sobre a cognição e o funcionamento global do SNC tem aumentado a discussão com relação aos seus reais valores terapêuticos (HOEY, 2007). Para uma doença neurodegenerativa, como a DA, uma intervenção terapêutica capaz de modificar a evolução natural da doença, ao lado da antecipação do diagnóstico, deverão representar o futuro do tratamento da DA e outras demências (VELLAS *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de opções terapêuticas mais eficazes e seguras consiste em um dos objetivos mais avidamente perseguidos no cenário científico internacional desta área. Para a avaliação da eficácia destas drogas, autoridades de registro de medicamentos exigem pelo menos efeitos estaticamente significativos em três parâmetros: a cognição, o funcionamento global e a autonomia nas atividades da vida diária. Estudos do potencial terapêutico de drogas como o fator de crescimento neuronal, antiinflamatórios não-estereoidais, antioxidantes, estrógenos, estatinas, inibidores da hiperfosforilação da tau e da terapia anti-amilóide, incluindo a imunoterapia da DA, são extensos mas ainda inconclusivos.

Especialmente pela ampla aceitação de *Ginkgo biloba* por idosos e os mecanismos de ação já conhecidos para extratos bem definidos desta espécie, tratamentos com outras plantas medicinais tem sido testados em modelos animais e celulares da DA, bem como em ensaios clínicos com pacientes com DA. A complexa patologia da DA e os heterogêneos efeitos farmacológicos dos extratos a partir de espécies vegetais são um desafio para o desenvolvimento de drogas naturais para DA, embora exatamente a complexidade de ambos possa ser vantajosa (HOUGHTON, 2003). Estes extratos tem propriedades multi-funcionais (pró-colinérgicos, antioxidantes, anti-amilóide e antiinflamatórios), e seu uso no tratamento de pacientes com DA é promissor.

Neste contexto, o extrato de *Ginkgo biloba* EGb 761 contém glicosídeos de



ginkgoflavonas e terpenóides, cuja ação combinada promove o aumento do suprimento sanguíneo cerebral por vasodilatação e redução da viscosidade sanguínea, além de reduzir a densidade de radicais livres de oxigênio nos tecidos nervosos (LUO, 2001). Modelos animais e celulares demonstraram que o EGb 761 exerce ação preventiva sobre a neurotoxicidade induzida pelo A $\beta$ , além de inibir vias apoptóticas e proteger os tecidos nervosos contra lesão oxidativa (LUO *et al.*, 2002; ZHOU & ZHU, 2000; SASTRE *et al.*, 2000). Os efeitos do EGb sobre a cognição normal foram avaliados em adultos jovens e idosos, com melhora objetiva na velocidade de processamento cognitivo, além de uma impressão subjetiva de melhora das habilidades gerais de memória (RIGNEY *et al.*, 1999; KENNEDY *et al.*, 2000; MIX & CREWS, 2002). Contudo, os estudos clínicos em paciente com DA mostraram resultados inconstantes. Um estudo multicêntrico sugeriu que o tratamento com EGb 761 por 52 semanas, na dose de 120 mg ao dia, proporcionou benefícios modestos, porém objetivamente detectáveis (LE BARS *et al.*, 1997; 2002). Em um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, pacientes com DA que receberam EGb 761 (240 mg/dia) por 52 semanas demonstraram melhora na memória visual, um menor grau de piora do déficit verbal e mínima melhora nos déficits visual e verbal (LE BARS, 2003). Estudo de metanálise (BIRKS *et al.*, 2002) mostrou, quanto à eficácia pela impressão clínica global, que existem benefícios em parâmetros cognitivos, de atividades da vida diária e humor, com superioridade em relação ao placebo. Entretanto, outros estudos apresentaram resultados inconsistentes, questionando a indicação da EGb no tratamento dos transtornos cognitivos (BIRKS *et al.*, 2002). Encontra-se em andamento alguns estudos multicêntricos internacionais para avaliar o efeito do EGb 761 na prevenção de demência do tipo DA.

Outra espécie bastante estudada quanto aos seus efeitos anticolinesterásico e neuroprotetor é a *Huperzia serrata* cujos efeitos são devido a presença do composto Huperzina A (HupA), um potente, seletivo e bem-tolerado inibidor da AChE. Estudos têm

demonstrado que a HupA tem pouco ou nenhum efeito colateral ou toxicidade em camundongos, ratos, coelhos e cachorros, sem fasciculação ou outros sintomas de hiperativação colinérgica, e não demonstram mudanças histopatológicas após administração subagudas (WANG *et al.*, 2006). Os efeitos anti-demência da HupA tem sido avaliado em estudos clínicos duplo-cego e controlado por placebo na China. Um grande número de estudos clínicos tem demonstrado que a administração de HupA pode melhorar significativamente a memória, a habilidade cognitiva e as tarefas da vida diária de pacientes com DA, sem apresentar efeitos colaterais graves (WANG *et al.*, 2006). Recentes estudos indicam que a HupA tem além da inibição da AChE múltiplos efeitos neuroprotetores, que incluem a regulação do metabolismo da APP e inibição de aspectos da neurotoxicidade associada ao A $\beta$ . Estes resultados podem esclarecer os correlatos moleculares da melhora clínica e experimental obtida com a HupA (ZHANG & TANG, 2006). Em outro estudo clínico, HupA foi administrada em pacientes com DA na dose de 300 mg/dia por 2-3 semanas seguidas de 400 mg/dia pelas próximas 4-12 semanas. Estes pacientes tiveram uma melhora significativa em suas funções cognitivas e não-cognitivas (ZHANG *et al.*, 2002). Considerando os dados de ensaios clínicos com HupA conduzidos na China, deu-se início em colaboração com o *National Institute on Aging and Alzheimer's Disease Cooperative Study* um ensaio clínico de fase II (<http://www.ClinicalTrials.gov>) para determinar a efetividade da HupA em pacientes com DA.

Cabe dizer que o papel de produtos naturais na terapêutica contemporânea é freqüentemente subestimado: das 20 substâncias mais vendidas no mundo em 1995, 11 continham um ingrediente ativo com estrutura baseada em produto natural (O'NEILL, 1998), num valor de US\$ 16,53 bilhões. Mesmo assim, o potencial das plantas superiores como fonte de novos medicamentos ainda é pouco explorado mesmo em países, como o Brasil, ricos em biodiversidade e culturas populares que fazem uso destas espécies e, portanto, conhecem suas

propriedades. Com base no uso e no papel inestimável que drogas de origem vegetal têm no alívio do sofrimento humano, quer por seu uso direto em grande parte da população mundial quer pelas drogas que foram desenvolvidas a partir de seu estudo, justifica-se a continuidade de pesquisas que busquem novas e melhores drogas derivadas de plantas.

### **1.6. Plantas medicinais: breve histórico**

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As civilizações mais primitivas já reconheciam a existência, de plantas dotadas de maior ou menor efeito biológico/toxicidade ao lado das plantas comestíveis, o que deu origem ao uso de algumas no combate à doenças. Toda essa informação foi sendo (e ainda o é) transmitida oralmente às gerações posteriores, para eventualmente serem compiladas e guardadas. Este conhecimento já bastante extenso sobre plantas medicinais e tóxicas é revelado ao serem estudadas civilizações antigas como, por exemplo, a chinesa e a hindu.

Somente no final do século XVIII, começa-se a isolar e determinar a estrutura dos constituintes ativos dos produtos de plantas dotados de propriedades medicinais. Derosne, em 1803, extrai do ópio a narcotina e uma mistura de alcalóides, da qual Serturner, em 1816, isola a morfina, Pelletier e Caventou, isolam a estriçnina, em 1818. Também, os primeiros heterosídeos foram obtidos nesta época: a salicina do salgueiro por Leroux, em 1830, que iria conduzir ao ácido acetilsalicílico, a amigdalina das amêndoas amargas por Robiquet e nesse mesmo ano, a digitalina da dedaleira por Nativelle, em 1868.

Em 1864, cientistas alemães isolaram o alcalóide fisostigmina do feijão de Calabar. Esta planta é nativa de uma área entre a Costa Oeste da África e a Nigéria, conhecida como Calabar. A planta é amplamente conhecida na África porque as favas tinham sido usadas como “veneno do calvário” para determinar se uma pessoa era bruxa ou possuía por espíritos

malignos. Quando usado para esta finalidade, a vítima era obrigada a ingerir diversos feijões; se a vítima regurgitasse os feijões e sobrevivesse ao “calvário” sua inocência era proclamada. Colonos estrangeiros que foram capturados por tribos nativas e foram submetidos à “provação” aprenderam a não mastigar o feijão evitando a liberação dos componentes tóxicos (BALICK & COX, 1996; PROUDFOOT, 2006). A fisostigmina foi a primeira substância caracterizada como um inibidor da AChE (BIRKS, 2006), e usada clinicamente em exames oftalmológicos e para reverter a intoxicação com anticolinérgicos. Além disso, a fisostigmina e a neostigmina (composto sintético derivado da fisostigmina) têm sido utilizadas para o diagnóstico e tratamento da miastenia gravis (GRAUS & DE BAETS, 1993).

A importância dos produtos naturais é enorme. Cerca de 25% das drogas prescritas mundialmente vêm de plantas, 121 compostos ativos como sendo de uso corrente. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais. Exemplos de drogas importantes obtidas de plantas são a digoxina de *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, atropina da *Atropa belladonna* e morfina e a codeína de *Papaver somniferum*. Estima-se que 60% dos anti-tumorais e drogas anti-infecciosas já existentes no mercado ou em ensaios clínicos são de origem natural (YUE-ZHONG SHU, 1998).

No entanto, o potencial uso de plantas superiores como fonte de novas drogas ainda é pouco explorado. Das estimadas 250.000-500.000 espécies de plantas, apenas uma pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente ou foi devidamente estudada em termos de suas propriedades farmacológicas (PAYNE *et al.*, 1991).

### **1.7. *Ptychopetalum olacoides*: etnofarmacologia e perfil psicofarmacológico**

A descoberta de drogas a partir de plantas medicinais tem evoluído para incluir numerosos campos de investigação e vários métodos de análise. O processo tem início com botânicos, etnobotânicos e etnofarmacólogos, que coletam e identificam a(s) planta(s) de interesse através de observações de campo com usuários. A coleta pode envolver espécies com atividade biológica conhecida ou apenas com propriedades terapêuticas alegadas pelos usuários e especialistas populares mas para as quais o(s) componente(s) ativo(s) não está(ão) ainda isolado(s). Pode-se ainda optar por coletar representantes de um Taxon coletado por se saber o rico em determinado tipo de composto, ou ainda coletas diversificadas e ao acaso (como bibliotecas de compostos químicos) para seleção posterior (triagem fitoquímica) por algum ensaio biológico (em geral automatizado). Os resultados mostram que as chances de acerto (hit) são muito maiores quando se parte da informação popular, do que de quimiotaxonomia ou coletas ao acaso (CARLSON *et al.*, 1997a).

*Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) (PO) (Figura 3) conhecida como Marapuama é uma planta utilizada tradicionalmente pelos caboclos da Amazônia como “tônico dos nervos”. Estes tônicos são usados como tratamento para uma síndrome conhecida como “fraqueza dos nervos”, relacionada a vários sintomas, especialmente de depressão, lassitude, impotência sexual e tremores (ELISABETSKY & SETZER, 1985; ELISABETSKY, 1987; ELISABETSKY *et al.*, 1992). A “fraqueza dos nervos” acomete especialmente idosos ou convalescentes de doenças em geral e, especificamente, daquelas que afetam o SNC (como “derrames”, dificuldades de concentração, melhora do estado geral de atenção), embora sintomas semelhantes possam ocorrer em indivíduos de qualquer idade que estejam passando por períodos de estresse intenso, psicológico ou físico (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

O conceito de “tônico dos nervos” é comum a muitos sistemas médicos tradicionais (ELISABETSKY & SETZER, 1985; MENDES & CARLINI, 2007). Espécies pertencentes a diversas famílias são utilizadas como fonte de “tônico dos nervos”, destacando-se

Apocynaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Longanaceae, Malphigiaceae e Rubiaceae, famílias com presença frequente de alcalóides e produtoras de compostos com reconhecidas atividades centrais (ELISABETSKY *et al.*, 1992). Embora PO seja uma das plantas mais utilizadas pelos caboclos amazônicos como “tônico dos nervos” (ELISABETSKY *et al.*, 1992), ela é mais conhecida pelo mercado como afrodisíaco (YOUNGKEN, 1921; STEINMETZ, 1962; FONSECA, 1981; SANGIRARDI, 1981; CABRAL & AGRA, 1996).



**Figura 3** – *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae). FONTE: <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/muira-puama-pic.htm>

Tradicionalmente, as raízes de PO são preparadas em infusões alcoólicas (em cachaça ou em vinho), mas pode ser encontrada no mercado de fitoterápicos também em várias outras formulações comerciais (pó seco, liofilizado, tinturas, misturas de extratos, composições polivitamínicas). O uso de PO é amplamente relatado também em outros lugares da Amazônia, inclusive a não-brasileira (SIQUEIRA *et al.*, 1998), e é encontrada em fitoterápicos no Brasil, Europa e EUA. Frequentemente são encontradas formulações de Marapuama em associação com outras plantas (tais como catuaba, ginseng, guaraná) ou em complexos vitamínicos (Muiru Puama-Herb-Pharm<sup>®</sup>). As alegadas propriedades terapêuticas

desses fitoterápicos incluem melhora do desempenho físico e mental, além de estimulante sexual.

Grande parte dos dados disponíveis sobre a farmacologia de PO foram obtidos com um extrato etanólico padronizado (EEPO), e são objeto de patentes (PI0307647-4 INPI/Br e US61/297442) depositadas por nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Etnofarmacologia da UFRGS). A descrição da síndrome caracterizada como “fraqueza dos nervos” inclui sintomas comuns à depressão, já que se pode interpretar parte dos sintomas descritos como anedonia. O EEPO foi ativo (50-200 mg/kg) em testes com valor preditivo para antidepressivos, como proteção da letalidade induzida por ioimbina e reversão da ptose induzida por reserpina (SIQUEIRA *et al.*, 1998), sugerindo uma possível ação no sistema noradrenérgico e/ou dopaminérgico. Mais recentemente verificou-se atividade tipo antidepressiva nos modelos de nado forçado e cauda suspensa em camundongos, possivelmente mediada pelos receptores  $\beta$ -adrenérgico e D<sub>1</sub>-dopaminérgico (PIATO *et al.*, 2009), confirmada por um modelo com melhor validade de face que é o estresse crônico imprevisível (PIATO *et al.*, 2010). Mais relevante para o contexto deste trabalho, foram também identificadas atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (SIQUEIRA *et al.*, 2002; 2007); neuroprotetora (SIQUEIRA *et al.*, 2004); anticolinesterásica *in vitro* e *in vivo* (SIQUEIRA *et al.*, 2003) e ação pró-mnésica tanto em camundongos adultos (da SILVA *et al.*, 2004; 2007; 2008) como em animais de 14 meses com déficit de memória (da SILVA *et al.*, 2004) além de reversão de amnésias induzidas por escopolamina e MK-801 (da SILVA *et al.*, 2009). Através do uso de antagonistas verificou-se que o efeito pró-mnésico de EEPO é modulado por receptores colinérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos, D<sub>1</sub>-dopaminérgico e serotoninérgico 5-HT<sub>2A</sub> (da SILVA *et al.*, 2009).

Embora ainda não tenha sido possível esclarecer em definitivo os composto(s) responsável(is) pelas ações detectadas com EEPO, foi identificado a presença de vários compostos de uma mesma classe com atividade anticolinesterásica, cujos detalhes encontram-

se em sigilo associado às patentes depositadas.

Entre os muitos passos necessários ao desenvolvimento deste extrato em um medicamento, é prioridade uma melhor caracterização da atividade anticolinesterásica com prova conclusiva sobre seu aceso ao SNC e sua atuação em áreas relevantes do encéfalo e a verificação de proteção contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ , considerando ser a DA a causa mais freqüente de demência.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foram caracterizar em um extrato etanólico padronizado de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO): a inibição das isoformas centrais de AChE, verificar se o tratamento por via oral induz inibição destas isoformas em áreas do SNC relevantes para cognição, e verificar se esta inibição é funcionalmente relevante quanto a aspectos da neurotoxicidade induzida por peptídeo beta-amilóide em camundongos.

### 2.2. Objetivos Específicos

#### 2.2.1. Caracterizar (*in vitro*) o efeito inibitório do EEPO sobre a atividade da AChE:

- a) Determinar o efeito inibitório do EEPO sobre a atividade específica das isoformas G1 e G4 da AChE em hipocampo, córtex frontal e estriado de camundongos;
- b) Determinar a concentração de EEPO necessária para inibir 50% da atividade específica da AChE (IC<sub>50</sub>) em hipocampo, córtex frontal e estriado de camundongos;
- c) Determinar o tipo de inibição do EEPO sobre as isoformas G1 e G4 da AChE, através da análise dos parâmetros cinéticos (Km e V<sub>máx</sub>) por Lineweaver-Burk em hipocampo de camundongos.

#### 2.2.2. Caracterizar a atividade anticolinesterásica e verificar a biodisponibilidade oral do extrato EEPO:

- a) Verificar os efeitos do EEPO sobre a atividade específica das isoformas G1 e G4 da AChE em hipocampo, córtex frontal e estriado de camundongos tratados com EEPO;
- b) Verificar histoquimicamente a atividade específica da AChE em hipocampo (CA1 e

CA3), estriado, córtex entorrinal e amígdala basolateral de camundongos tratados com EEPO;

- c) Verificar se a modulação dos níveis de AChE está associada a diminuição do conteúdo da enzima em hipocampo e córtex frontal de camundongos tratados com EEPO (Western Blotting).

### **2.2.3. Efeito do EEPO em modelo animal de DA [infusão do peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ):**

- a) Avaliar os efeitos do tratamento com EEPO sobre a memória de camundongos submetidos a infusão i.c.v. de A $\beta$  no teste de esquiva inibitória;
- b) Determinar os efeitos do tratamento com EEPO sobre os níveis de BDNF em camundongos submetidos a infusão i.c.v. de A $\beta$ ;
- c) Avaliar os efeitos do tratamento com EEPO na progressão da degeneração induzida por A $\beta$  (extensão dos depósitos de A $\beta$  (Congo red), imunoreatividade da GFAP e perda neuronal na camada piramidal de CA1) em camundongos.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

**3.1.1.** Micheli Figueiró; Marina Comachio; Daniela Pochmann; Lisiane O. Porciúncula; Domingos Sávio Nunes; Elaine Elisabetsky. **Inhibitory effects of an Amazonian herbal on acetylcholinesterase isoforms in mouse hippocampus, striatum and frontal cortex** (Artigo em preparação).

**Inhibitory effects of an Amazonian herbal on acetylcholinesterase isoforms in mouse hippocampus, striatum and frontal cortex.**

**Micheli Figueiró<sup>a,b</sup>, Marina Comachio<sup>a</sup>, Daniela Pochmann<sup>c</sup>, Lisiane O. Porciúncula<sup>c</sup>, Domingos Sávio Nunes<sup>d</sup> and Elaine Elisabetsky<sup>a,b,\*</sup>.**

<sup>a</sup> Laboratório de Etnofarmacologia, <sup>b</sup>PPG- Neurociências, <sup>c</sup>Laboratório de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, PPG-Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>d</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas, Bloco M, Ponta Grossa, PR, Brazil.

**\*Corresponding author:** Elaine Elisabetsky, Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90041-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3308-3569, Fax: +55 51 3308-3121.  
E-mail address: elaine.elisabetsky@gmail.com

**Abstract**

A declining cholinergic neurotransmission is partially responsible for cognitive deficits, either in normal aging or dementias. As a result pharmacotherapy for the cognitive deficits observed in Alzheimer's disease still relies on the use of acetylcholinesterase inhibitors (AChE-Is). Two major AChE molecular isoforms are found in the brain: the cytosolic globular monomer (G1) and membrane bound globular tetramer (G4). There is evidence that AChE-Is, including those of clinical significance, differentially inhibit these isoforms. Promnesic, anti-amnesic, antioxidant, neuroprotective and anticholinesterasic properties were identified in a standardized ethanol extract of *Ptychopetalum olacoides* (POEE), a medicinal species favored by the elderly in Amazon communities. The purpose of this study was to further characterize the AChE inhibition pattern of POEE on G1 and G4 in brain areas relevant for cognition. We show that POEE mostly inhibits ( $p < 0.05$ ) G1 in hippocampus (75%), and G4 in frontal cortex (58%) and striatum (75%). Kinetic analysis indicates that POEE-induced inhibition in hippocampus is of a competitive nature for G1 and uncompetitive for G4. Considering the high density of cholinergic projections to the cortex and striatum, and the usefulness of conserving cytosolic acetylcholine to replenish synaptic vesicles in a highly active cognition site such as the hippocampus, we argue that this could be a desirable profile for a clinically relevant AChE-I.

**Key words:** Acetylcholinesterase isoform, *Ptychopetalum olacoides*, cognitive deficits, acetylcholinesterase inhibitors

## **Introduction**

*Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae), known as Marapuama, is a medicinal plant widely used by Amazonian communities, and especially favored by the elderly. Coherently with users' claims, this research group has established antidepressant (Piato et al. 2009), antioxidant (Siqueira et al. 2007), neuroprotective (Siqueira et al. 2004), promnesic (da Silva et al. 2004, 2008) and anti-amnesic properties (da Silva et al. 2009) for a standardized ethanol extract (POEE) of Marapuama.

Cognitive deficits are often associated with aging, and are a core symptom in dementias, both of which are expected to increase in prevalence due to the expanded human life expectancy (Panza et al. 2006; Rauk 2009). Actually more than 25 million people in the world are affected by dementia (Qiu et al. 2009). Alzheimer's disease (AD) has become the commonest form of dementia in the elderly, currently affecting nearly 2% of this population in developed countries (Mattson 2004). Adding to the inevitable suffering, the marked cognitive and neuropsychiatric manifestations associated with AD also result in progressive disability with high costs to families and public health (Chattipakorn et al. 2007). Unfortunately, the success with available therapy either using memantine (uncompetitive NMDA receptor antagonist), acetylcholinesterase inhibitors (AChE-Is) or its combination is meager (Giacobini 2003b; Hartmann and Mobius 2003; Tariot et al. 2004; Cummings et al. 2006; Pepeu and Giovannini 2009).

The cholinergic system has been shown to be the predominantly affected neurotransmitter system in AD (Giacobini 2003a). The reduction in cholinergic activity is correlated with the degree of cognitive impairment, and results from decreased levels of choline acetylcholinesterase (the rate limiting enzyme for ACh synthesis), acetylcholine (ACh), and acetylcholinesterase isoforms (AChE, ACh degradation enzymes) (Lane et al. 2004). Consequently, research efforts have focused on strategies to enhance cholinergic

neurotransmission which in principle could entail stimulating ACh synthesis, directly stimulating nicotinic/muscarinic receptors and/or inhibiting ACh degradation (Mantle et al. 2000). Nevertheless, only the latter approach has entered the therapeutic armamentarium.

AChE (EC 3.1.1.7) is recognized to occur in different molecular isoforms, distinguishable by their subunit associations and hydrodynamic properties (Brimijoin 1983; Massoulié et al. 1993). The two major isoforms in the brain are the globular monomer (G1) cytosolic form and the globular tetramer (G4) membrane bound form (Massoulié et al. 1993; Massoulié 2002). It has also been found that these isomeric forms have different cellular distribution and functional significance in synaptic transmission (Brimijoin 1983). In healthy human brain, G1 and G4 AChE isoforms are responsible for 80% of total cholinesterase activity (Atack et al. 1986), whereas in AD brain there is a selective loss of G4 and a relative sparing of G1 (Siek et al. 1990; Schegg et al. 1992). Isoform specificity varies among clinically relevant AChE-Is: galanthamine does not show selectivity, donepezil preferentially inhibits G4, and rivastigmine G1 (Rakonczay 2003; Lane et al. 2004; 2006). Isoform specific selectivity may be of relevance to improve therapeutics if appropriate targets could be elected (Zhao and Tang 2002).

The clinical relevance of the alkaloid galanthamine, along with the limited efficacy and considerable side effects of currently available AChE-Is contributed to a renewed interest in the scrutiny of medicinal plants extracts and/or their isolated compounds for the treatment of AD (Mantle et al. 2000). Additionally, Huperzine A (HupA) (derived from *Huperzia serrata*) has proved to be a potent, selective and well tolerated AChE inhibitor, presenting minute side effects or toxicity in mice and humans. The antidementia effects of the HupA has been evaluated in double-blind placebo-controlled clinical studies in China, with significant memory, cognitive and daily tasks abilities improvements in AD patients (Wang et al., 2006).

Anticholinesterasic properties also were identified for POEE and are likely to underlie its



memory enhancing effects (Siqueira et al. 2003). The purpose of this study was to further characterize the inhibitory effect of POEE in mouse brain areas relevant for cognition (hippocampus, frontal cortex, and striatum), taking into account specificities for G1 and G4 isoforms. Additionally, the nature of inhibition was determined in the hippocampus.

## **Material and Methods**

### **Subjects**

Male (CF1) adult (2 months old, 35–45 g) albino mice were obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Animals were maintained in our own animal facility under controlled environmental conditions ( $22\pm 1$  °C, 12 h-light/dark cycle, free access to food [NUVILAB CR1], and water), for at least two weeks before the experiments. The project was approved by the University ethics committee (approval # 2007834, 2008).

### **Plant material and standardized extract**

Roots of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) were collected in the region of the Capim River (Pará State, Brazil), and identified by Nelson Rosa (voucher MPEG n° 108.036 deposited at the Goeldi Museum herbarium). Ground roots (2.5 kg) were exhaustively (40h) extracted in Soxhlet with ethanol (12 L) (40 h), and evaporated under reduced pressure to yield POEE (6g of extract per 100g of drugs). The HPLC of the extract used in this study can be seen at Siqueira et al. (2003). Briefly, the HPLC analysis was obtained with an HP 1100 system equipped with photodiode array detector (Agilent Technologies), using a Zorbax extended C18 column (250 x 4.6 mm) with the MeOH-H<sub>2</sub>O gradient (10:90–100:0). UV traces were measured at 210 and 254 nm, and UV spectra were recorded between 200 and 500 nm. The chemical profile of *Ptychopetalum* species is largely unknown. Lipids, flavonoids, methylxanthines (Montrucchio et al. 2002) have been reported for this species. Despite older and confusing references to “muyrapuaimin”, alkaloids are not present in the species or the

extract here used.

### **Drugs**

Acetylthiocholine iodide (ATC), 5,5-dithiobis (2-nitro-benzoic acid) (DTNB), bovine serum albumin (BSA), Tris (hydroxymethyl-d<sub>3</sub>) amino-d<sub>2</sub>-methane, tetraisopropyl pyrophosphoramidate (iso-OMPA), and eserine were obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and DMSO were obtained from Quimibrás Reagen (Rio de Janeiro, Brazil). POEE was dissolved in DMSO 20%.

### **AChE isoform sources**

Mice were sacrificed by guillotine, then the brains were quickly removed, cleaned with chilled saline, and cerebral structures dissected out over ice. The hippocampus, frontal cortex, and striatum were homogenized in 20, 10 and 20 volumes of buffer (0.01 M Tris-HCl buffer, pH-7.2 and 0.16 M sucrose), respectively, and centrifuged at 5000 x g at 4°C for 15 min (Eppendorf Centrifuge 5415R). The resulting supernatants were used as the G1 source (Das et al., 2001). The pellet was suspended in 1% Triton-X 100 (1% w/v in 0.5 M potassium phosphate buffer, pH-7.5) and centrifuged at 100,000 x g at 4°C in a Hitachi Refrigerated Centrifuge for 60 min. The supernatant was collected and used as the G4 source (Das et al. 2001).

### **AChE activity**

Determination of AChE activity was adapted from the colorimetric method originally described by Ellman et al. (1961). Briefly, adequate volumes of the following reagents were added to microplates so that 10 mM DTNB, Tris-HCl buffer, POEE (0-1000 µg/mL), and enzymatic material (3 µg/µL of protein for G1 or G4 AChE) were incubated ATC (final concentration of 0.8 mM). The incubation solution contained the butyrylcholinesterase inhibitor tetraisopropyl pyrophosphoramidate (iso-OMPA) at a final concentration of 100 µM in order to specifically measure AChE activity. The microplate was read at 415 nm every 30 s

for 2.5 min (Microplate Reader Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK). Experiments were performed in triplicate. AChE activities are expressed as  $\mu\text{mol}$  of acetylthiocholine hydrolyzed/hour/milligram of protein ( $\mu\text{mol ATC/h/mg protein}$ ).

### **Kinetics analysis**

To determine the type of enzyme inhibition, Lineweaver-Burk double reciprocal plots were produced by varying the concentration of the substrate ATC from 0.01 to 0.075 mM in the hippocampus. Plots were used to determine  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  for POEE using 0, 30, 100, 300 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Specific activities are expressed as  $\mu\text{mol ATC/h/mg protein}$ .

### **Protein assay**

The protein content was determined as described by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

### **Statistical analysis**

The data were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post hoc test.  $p < 0.05$  was adopted as the least significant level.

## **Results**

### **Effects of POEE on G4 and G1 AChE isoforms**

Figures 1a-b, 2a-b and 3a-b shows the effects of POEE (0-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) on G1 and G4 from hippocampus, frontal cortex and striatum, respectively. The experimental conditions were validated with eserine (27.5  $\mu\text{g/mL}$ ) which inhibited G1 and G4 in all tissues ( $p < 0.05$ ); DMSO was devoid of effect. POEE significantly inhibited G1 in hippocampus [100 and 300  $\mu\text{g/mL}$ ,  $F(6,28) = 59.2$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 1a], frontal cortex (30-1000  $\mu\text{g/mL}$ ,  $F(6,28) = 32.5$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2a], and striatum [1000  $\mu\text{g/mL}$ ,  $F(6,28) = 30.6$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 3a]. The activity of G4 was also significantly reduced in hippocampus [100  $\mu\text{g/mL}$ ,  $F(6,28) = 114.3$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 1b], frontal cortex [30-1000  $\mu\text{g/mL}$ ,  $F(6,28) = 174.0$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2b] and striatum [30-

1000  $\mu\text{g/mL}$ ,  $F(6,28) = 82.3$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 3b]. POEE appears to preferentially affect G1 in hippocampus (up to 75% of inhibition x 60% for G4), while G4 appears to be more markedly affected in the frontal cortex and striatum (up to 58% and 75% of inhibition, respectively). In the same concentration range POEE did not ( $p > 0.05$ ) inhibit BuChE activity (hippocampus,  $F(6,28) = 10.9$ ; frontal cortex,  $F(6,28) = 14.9$ ; striatum,  $F(6,28) = 13.7$ , data not shown).

### **Kinetic analysis**

The kinetic analysis performed in hippocampus by Lineweaver-Burk plot revealed that POEE inhibited G1 in a competitive manner (Fig. 4a), whereas inhibition of G4 was uncompetitive (Fig. 4b).  $K_m$  and  $V_{\max}$  values are shown in Table 1.

### **Discussion**

Adding to earlier analysis on the effects of POEE on AChE activity, this study shows that POEE markedly inhibits G1 and G4 AChE isoforms in brain areas relevant for cognitive processes, such as hippocampus, frontal cortex and striatum. In the frontal cortex, the concentration-effect curve appears to be bell shaped, whereas for hippocampus and striatum a U shaped curve is apparent. As often found with complex mixtures such as plant extracts, the fact that POEE is a mixture of active and not active compounds, possibly with various structurally related compounds with anticholinesterase properties, may account for the lack of a clear concentration-effect relationship. Nevertheless, results were surprising since increasing inhibitory activity with increasing concentration of POEE has been previously reported (Siqueira et al. 2003). Possible reasons for discrepant results may lay in the concentration and time used for in vitro incubations, and especially in the use of total AChE in contrast to isoforms as used in this study. Since POEE in DMSO is a suspension it is also possible that eventually suspended particules in a diminute space such as plate wells may have interfered with a proper interaction of compounds and enzymes. The definition of a clearer dose-effect relationship is nevertheless warranted, and the availability of isolated compounds will be

useful in this context.

It has been argued that an increased G1/G4 ratio is found in AD patients due to the differential decrease in G1 and G4 expression, suggesting that an optimum AChE inhibitor for treating AD would preferentially inhibit G1 (Siek et al. 1990; Schegg et al. 1992).

Incongruously, the highly promnesic and neuroprotective alkaloid Huperzine A is a G4-selective inhibitor in multiple brain areas, and effective in mouse models of  $\beta$ -amyloid-induced dementia (Wang et al. 2001; Zhao and Tang 2002). As mentioned above, this is also the case with donepezil (Rakonczay 2003; Lane et al. 2004; 2006). Although a definitive analysis requires isolated compounds and their various combinations, in this study POEE shows a clearly selective pattern of inhibition for different AChE isoforms. The data indicate that while G1 is preferentially inhibited by POEE in the hippocampus, G4 is more strongly affected in the frontal cortex and striatum. We argue that this could be a desirable profile in the context of cognitive deficits, considering the high density of cholinergic projections to the cortex and striatum, and the usefulness of conserving cytosolic acetylcholine (pools) to replenish synaptic vesicles in a highly active cognition site such as the hippocampus. Although the clinical relevance of such neuropharmacological differences in AChE inhibition profiles remains to be clarified, isoform- and region-specific relative potencies of AChE-inhibition are factors that are bound to influence efficacy as well as tolerability profiles.

The kinetic analysis indicates that, at least for hippocampus, POEE-induced AChE inhibition also differs for the two AChE isoforms. For G1 POEE acts as a competitive inhibitor, whereas for G4 the inhibition is of an uncompetitive nature. The nature of inhibition may be determined by the microenvironment surrounding the active site, which at the same time is a contributing factor in determining the selectivity for both substrate and AChE isoforms (Zhao and Tang 2002). As for isoforms specificity, a detailed understanding of the interaction of G1 and G4 with POEE requires the structural elucidation of the active compound(s).

The outcome of this study is consistent with both the traditional claims for *P. olacoides* based home remedies and POEE's nootropic profile in mice. We reported that this standardized extract improves various phases of memory in different behavioral tasks (long-term memory retrieval and short term memory acquisition, consolidation and retrieval in step-down inhibitory avoidance and object recognition tasks) (da Silva et al. 2004; 2007). Moreover, POEE was able to reverse age, scopolamine, and MK-801-induced amnesias (da Silva et al. 2004; 2009). It is noteworthy that these effects were obtained with orally treated mice, while the signs expected from peripherally acting AChE with POEE given acutely or for 21 days were absent (da Silva et al. 2004; 2008).

This study refines the proposal that an improvement in cholinergic function in cognition relevant areas by POEE is likely to be a neurochemical correlate of its memory facilitating effects. The data also point to the relevance of giving specific attention to AChE molecular isoforms in developing AChE-Is effective for the treatment of cognitive disorders.

### **Acknowledgements**

This study is associated with/protected by patents nos. PI0307647-4, INPI/Br; US61297442

The authors are grateful to CNPq for fellowships.

### **References**

Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH (1986) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development: a study of molecular forms. *Neurochem Int* 21:381–396.

Brimijoin S (1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Prog Neurobiol* 21:291-322.

- Chattipakorn S, Pongpanparadorn A, Pratchayasakul W, Pongchaidacha A, Ingkaninan K, Chattipakorn N (2007) *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *J Ethnopharmacol* 110:61-68.
- Cummings JL, Schneider E, Tariot PN, Graham SM (2006). Behavioral effects of memantine in Alzheimer disease patients receiving donepezil treatment. Memantine MEM-MD-02 Study Group. *Neurology* 67(1):57-63.
- da Silva AL, Piato AL, Bardini S, Netto CA, Nunes DS, Elisabetsky E (2004) Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. *J Ethnopharmacol* 95:199-203.
- da Silva AL, Piato AL, Ferreira JG, Martins BS, Nunes DS, Elisabetsky E (2007) Promnesic effects of *Ptychopetalum olacoides* in aversive and non-aversive learning paradigms. *J Ethnopharmacol* 109:449-457.
- da Silva AL, Ferreira JG, da Silva Martins B, Oliveira S, Mai N, Nunes DS, Elisabetsky E (2008) Serotonin receptors contribute to the promnesic effects of *P. olacoides* (Marapuama). *Physiol Behav* 95(1-2):88-92.
- da Silva AL, da Silva Martins BD, Linck V, Herrmann AP, Mai N, Nunes DS, Elisabetsky E (2009) MK801- and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a "brain tonic". *Psychopharmacology* 202;165-172.
- Das A, Dikshit M, Nath C (2001) Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci* 68:1545-1555.
- Ellman GL, Courtney KD, Andre VJr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 27-30.

- Giacobini E (2003a) Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 18:S1-S5.
- Giacobini E (2003b) Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 28:515-522.
- Hartmann S, Mobius, HJ (2003). Tolerability of memantine in combination with cholinesterase inhibitors in dementia therapy. *Int Clin Psychopharmacol.* 18(2):81-85.
- Lane RM, Kivipelto M, Greig NH (2004) Acetylcholinesterase and Its Inhibition in Alzheimer Disease. *Clin Neuropharmacol* 27:141–149.
- Lane RM, Potkin SG, Enz A (2006) Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 9(1):101-24.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mantle D, Pickering AT, Perry EK (2000) Medicinal Plant Extracts for the Treatment of Dementia: A Review of their Pharmacology, Efficacy and Tolerability. *CNS Drugs* 13:201-213.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 41:31–91.
- Massoulié J (2002) The origin of molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 11:130-143.
- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-39.



Montrucchio DP, Miguel OG, Miguel MD, Cúnico MM, Silva VC, Kerber VA (2002).

Constituintes químicos de *Ptychopetalum olacoides*. XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Centro de Eventos do Pantanal, Cuiabá, MT. Cd room do congresso.

Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Pichichero G, Capurso SA, Capurso A, Solfrizzi V (2006) Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev* 51:275-292.

Pepeu G, Giovannini MG (2009) Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr Alzheimer Res* 6:1-11.

Piato, A.L.; Rizon, L.P.; Martins, B.S.; Nunes, D.S.; Elisabetsky, E. Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Marapuama) in mice. *Phytother. Res.*, 23:519-524, 2009.

Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 11:111-128.

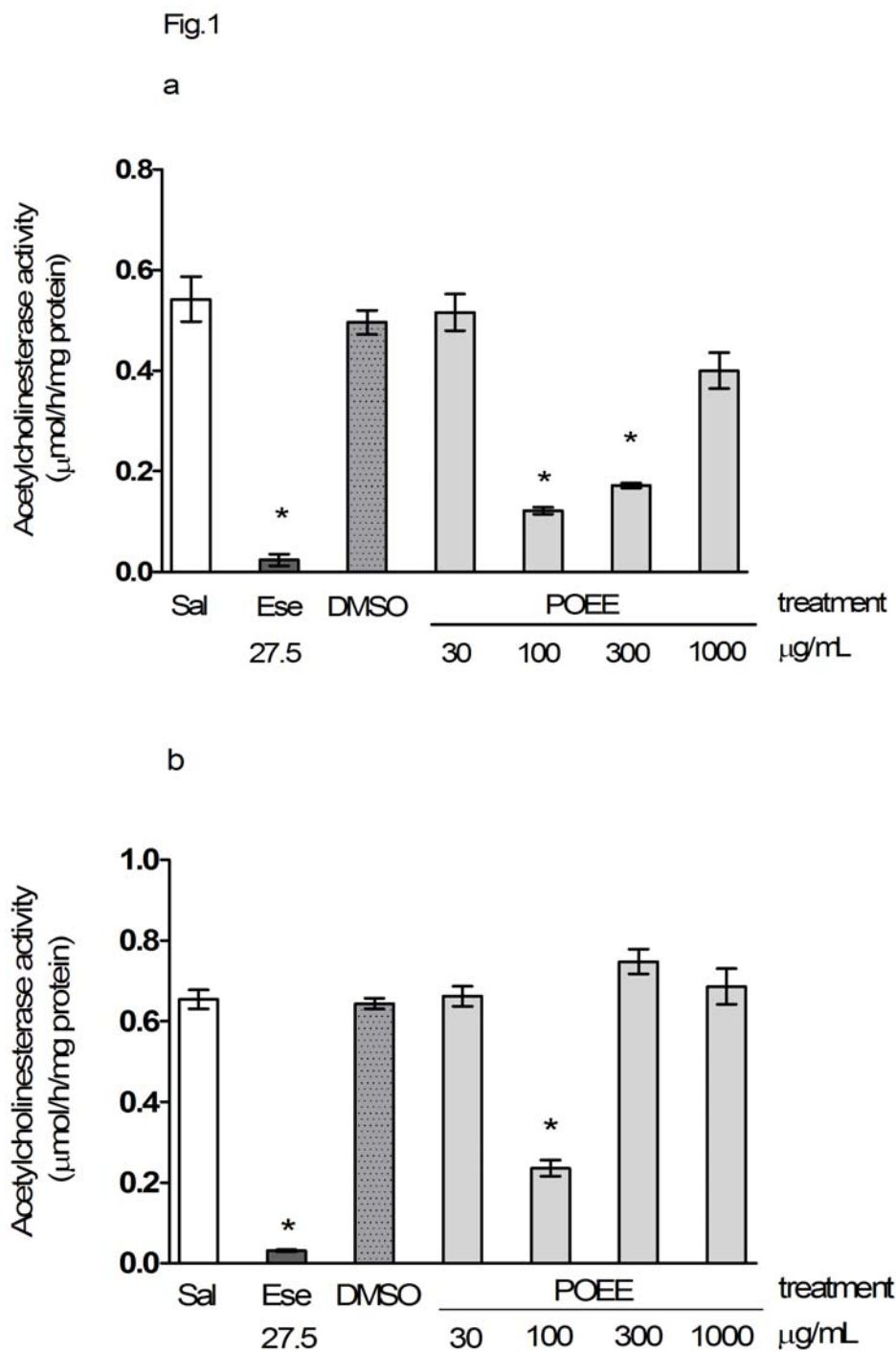
Rakonczay Z (2003) Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biol Hung* 54:183-189.

Rauk A (2009) The chemistry of Alzheimer's disease. *Chem Soc Rev* 38:2698-2715.

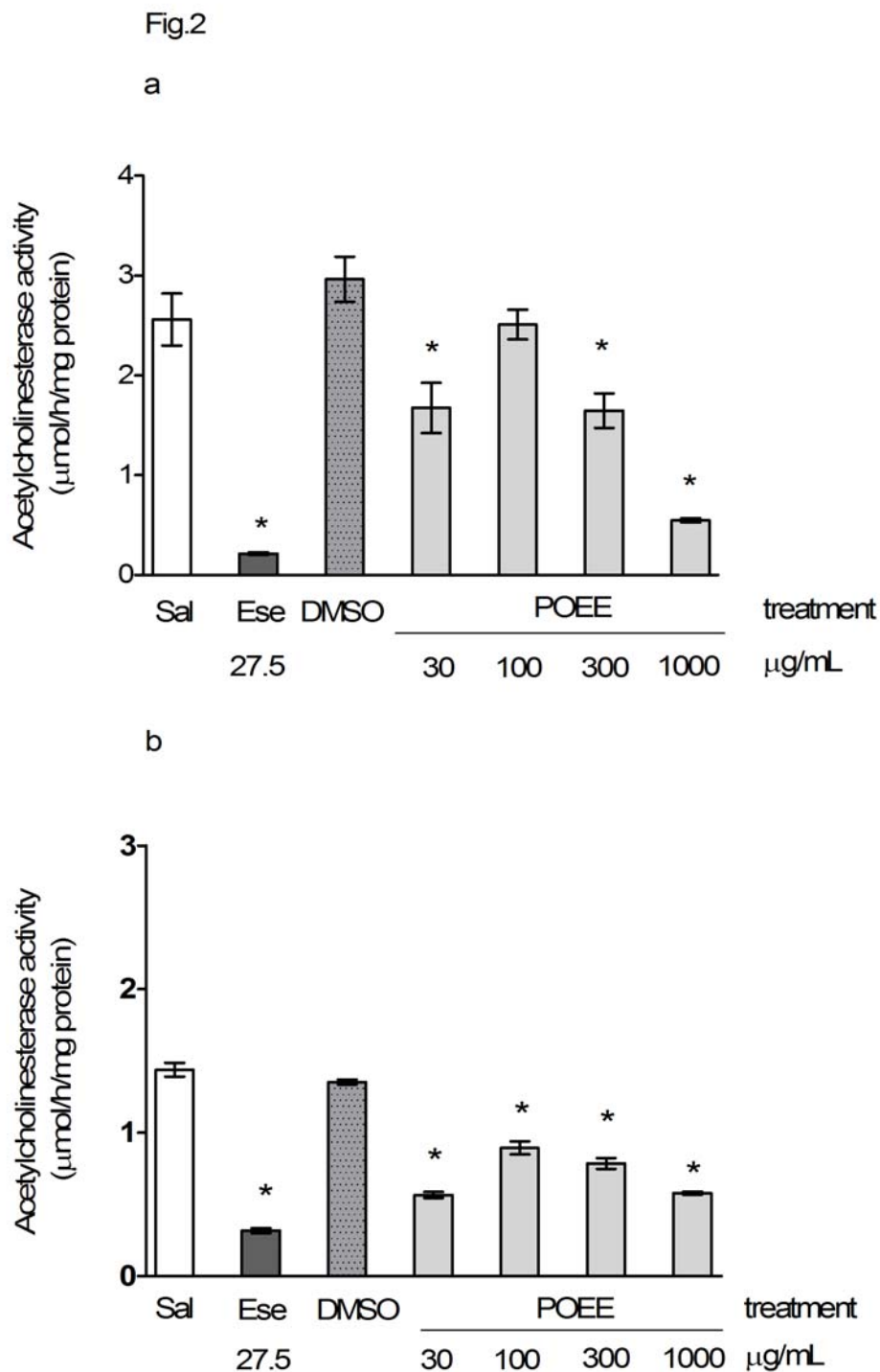
Schegg KM, Harrington LS, Neilsen S, Zweig RM, Peacock JH (1992) Soluble and membrane-bound forms of brain acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13:697-704.

Siek GC, Katz LS, Fishman EB, Korosi TS, Marquis JK (1990) Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biol. Psychiatry* 27:573-580.

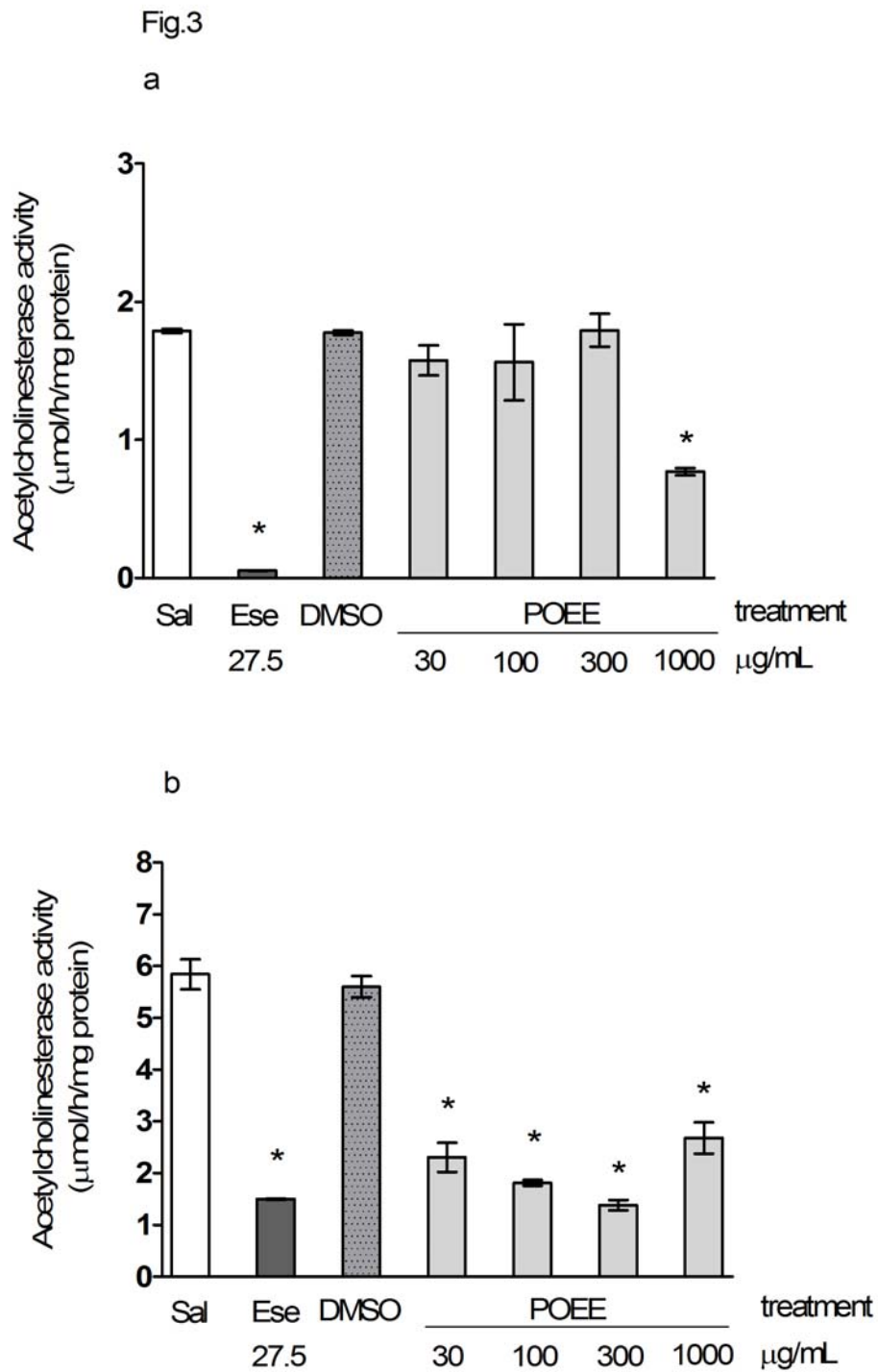
- Siqueira IR, Fochesatto C, da Silva AL, Nunes DS, Battastini AM, Netto CA, Elisabetsky E (2003) *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. *Pharmacol Biochem Behav* 75(3): 645-650.
- Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Nunes DS, Salbego C, Elisabetsky E, Netto CA, (2004) Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sci* 75(15):1897-906.
- Siqueira IR, Fochesatto C, Torres IL, da Silva AL, Nunes DS, Elisabetsky E, Netto CA, (2007) Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. *Phytomedicine* 14(11):763-769.
- Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I (2004). Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA*. 291(3):317-324.
- Wang R, Zhang HY, Tang XC (2001) Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by  $\beta$ -amyloid protein (1-40) in rat. *Eur J Pharmacol* 21:149-156.
- Wang R, Yan H, Tang XC (2006). Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol. Sin* 27:1-26.
- Zhao Q, Tang XC (2002) Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *Eur J Pharmacol* 455:101-107.



**Fig. 1** Effect of POEE and eserine on G1 (a) and G4 (b) AChE isoforms in mouse hippocampus. SAL=saline; ESE=Eserine. All assays were performed in triplicate for five separate experiments. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs. control (saline and DMSO). The graphic was constructed using the software package Prism Graph Pad 5.0.

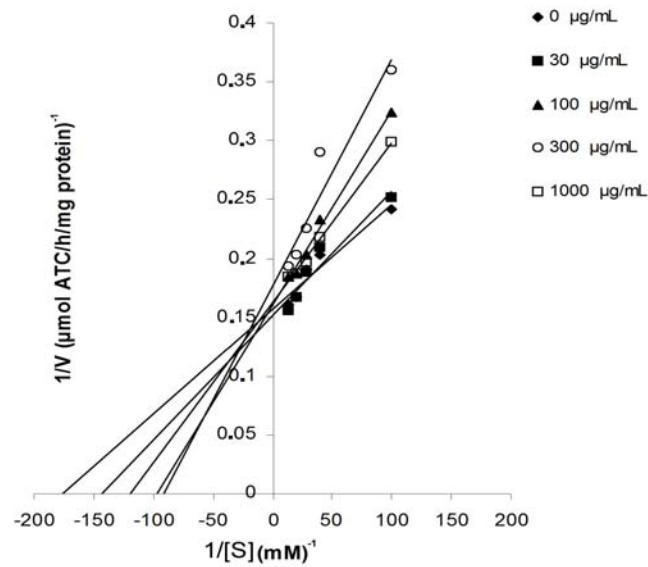


**Fig. 2** Effect of POEE and eserine on G1 (a) and G4 (b) AChE isoforms in mouse frontal cortex. SAL=saline; ESE=Eserine. All assays were performed in triplicate for five separate experiments. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs. control (saline and DMSO). The graphic was constructed using the software package Prism Graph Pad 5.0.

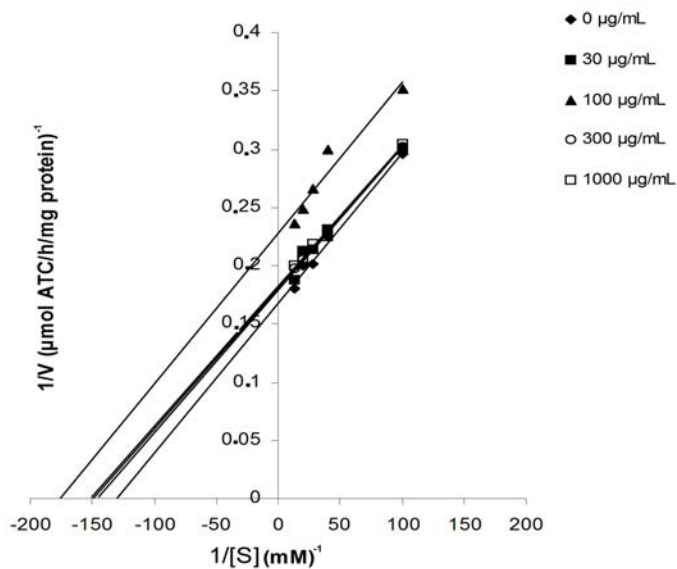


**Fig. 3** Effect of POEE and eserine on G1 (a) and G4 (b) AChE isoforms in mouse striatum. SAL=saline; ESE=Eserine. All assays were performed in triplicate for five separate experiments. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs. control (saline and DMSO). The graphic was constructed using the software package Prism Graph Pad 5.0.

A



B



**Fig. 4** Lineweaver–Burk representation of G1 AChE (a) and G4 AChE (b) inhibition by POEE in the hippocampus with acetylthiocholine as substrate. Double reciprocal plot was constructed in Microsoft Excel 2003 by plotting  $1/V$  against  $1/S$  analyzed over a range of substrate concentrations (0.01-0.075 mM) in the absence and in the presence of POEE (30, 100, 300 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). The plot represents the means of five experiments ( $n = 5$ ).

**Table 1:** Effect of POEE on  $K_m$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) and  $V_{\text{max}}$  ( $\mu\text{mol ATC/h/mg protein}$ ) of hippocampus G1 and G4 AChE.

	[POEE] ( $\mu\text{g/mL}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol ATC/h/mg protein}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
G1 AChE	0	5.86	7.91
	30	6.27	9.14
	100	6.11	10.63
	300	5.68	11.06
	1000	6.45	12.84
G4 AChE	0	6.05	8.29
	30	5.74	7.61
	100	4.11	6.0
	300	4.36	6.05
	1000	4.43	6.37

$V_{\text{max}}$  and  $K_m$  were measured on Lineweaver-Burk double reciprocal plots varying the concentration of the substrate ATC from 0.01 to 0.075 mM, and using increasing POEE concentrations (0, 30, 100, 300 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) in hippocampus.

**3.1.2.** Micheli Figueiró; Jocemar Ilha; Daniela Pochmann; Lisiane O. Porciúncula; Léder L. Xavier ; Matilde Achaval; Domingos S. Nunes; Elaine Elisabetsky. **Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal (Marapuama). Artigo *in press* (Phytomedicine).**





Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: [www.elsevier.de/phyomed](http://www.elsevier.de/phyomed)

## Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal (Marapuama)

M. Figueiró<sup>a,b</sup>, J. Ilha<sup>b,d</sup>, D. Pochmann<sup>c</sup>, L.O. Porciúncula<sup>c</sup>, L.L. Xavier<sup>e</sup>, M. Achaval<sup>d</sup>,  
D.S. Nunes<sup>f</sup>, E. Elisabetsky<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> PPG-Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, PPG-Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Histoфизиologia Comparada, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, PUC-RS, Av. Ipiranga, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas, Bloco M, Ponta Grossa, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Acetylcholinesterase inhibitors  
*Ptychopetalum olacoides*  
 Cognitive deficits  
 Neurodegenerative disorders

### ABSTRACT

The goal of acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) used to treat Alzheimer's patients is an improvement in cholinergic transmission. While currently available AChEIs have limited success, a huge impediment to the development of newer ones is access to the relevant brain areas. Promnesic, anti-amnesic and AChE properties were identified in a standardized ethanol extract from *Ptychopetalum olacoides* (POEE), a medicinal plant favored by the elderly in Amazon communities. The purpose of this study was to provide conclusive evidence that orally given POEE induces AChE inhibition in brain areas relevant to cognition. Histochemistry experiments confirmed that the anticholinesterase compound(s) present in POEE are orally bioavailable, inducing meaningful AChE inhibition in the hippocampus CA1 (~33%) and CA3 (~20%), and striatum (~17%). Ellman's colorimetric analysis revealed that G1 and G4 AChE isoforms activities were markedly inhibited (66 and 72%, respectively) in hippocampus and frontal cortex (50 and 63%, respectively), while G4 appeared to be selectively inhibited (72%) in the striatum. Western blotting showed that POEE did not induce significant changes in the AChE immunocontent suggesting that its synthesis is not extensively modified. This study provides definitive proof of meaningful anticholinesterase activity compatible with the observed promnesic and anti-amnesic effects of POEE in mice, reaffirming the potential of this extract for treating neurodegenerative conditions where a hypofunctioning cholinergic neurotransmission is prominent. Adequate assessment of the safety and efficacy of this extract and/or its isolated active compound(s) are warranted.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Moderate degenerative changes during ageing have been shown to occur in cholinergic neurons of the basal forebrain complex (Schliebs and Arendt 2006), contributing to the age-associated cognitive decline (Bartus et al. 1982). However, in Alzheimer's disease (AD) there is a marked acetylcholine (ACh) hypofunction thought to result from decreased levels of choline acetyltransferase, the rate-limiting enzyme for ACh synthesis (Lane et al. 2004).

Because the reduction in cholinergic activity is correlated with the degree of cognitive impairment (Francis et al. 1999), several

drugs have been designed to enhance cognitive function in AD patients by targeting acetylcholinesterase (AChE), in an attempt to maximize the effect of ACh by increasing its permanence in the synaptic cleft (Barnes et al. 2000). In general, AChE inhibitors have limited success as they only improve memory in mild dementia (Sonkusare et al. 2005). Nevertheless, galanthamine, rivastigmine, and donepezil are still considered the most effective treatments for early AD stages (Francotte et al. 2004; Van Marum 2008). The marked peripheral effects of these drugs and lack of acceptable efficacy prevent their utilization in a broader range of cognitive deficits (Birks and Flicker 2006).

The staggering numbers of patients currently suffering from neurodegenerative disorders, combined with the expected increase due to an extended life expectancy worldwide, calls for the development of drugs useful in minimizing cognitive deficits. *Ptychopetalum olacoides* Benth (Omalaceae), known as Marapuama, is a medicinal plant favored by the elderly in Amazonian commu-

\* Corresponding author at: Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90041-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 3569; fax: +55 51 3308 3121.

E-mail address: [elaine.elisabetsky@gmail.com](mailto:elaine.elisabetsky@gmail.com) (E. Elisabetsky).

nities (Elisabetsky and Siqueira 1998). Coherent with users' claims, this research group has established promnesic (da Silva et al. 2004, 2007, 2008), anti-amnesic (da Silva et al. 2009) neuroprotective (Siqueira et al. 2004) and antidepressant (Piato et al. 2008) properties for a standardized ethanol extract (POEE) of Marapuama. As neurochemical correlates of these properties, antioxidant (Siqueira et al. 2007) and anticholinesterasic effects (Siqueira et al. 2003) have also been identified.

A huge impediment to the development of drugs for the treatment of CNS diseases is the blood-brain barrier (BBB) (Pardridge 2009), and the extent to which a drug can readily penetrate the BBB determines its bioavailability within the CNS (Anekonda and Reddy 2005). Therefore, although traditional claims for Marapuama-based formulas and the above mentioned data on experimental models of memory and depression constitute evidence of CNS effects, the purpose of this study was to provide conclusive data on POEE-induced AChE inhibition in brain areas relevant to cognition. Histochemical and biochemical assessments were chosen to verify the effects of orally given POEE in a dose found to ameliorate several memory types (da Silva et al. 2007) and reverse age-, scopolamine- and MK801-induced amnesias (da Silva et al. 2004, 2009) in mice. In addition, western blotting analysis was performed to verify if the AChE inhibition is associated with enzyme loss.

## Methods

### Animals

Male (CF1) adult (2 months old, 35–45 g) albino mice were obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Animals were maintained under controlled environmental conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12-h light/dark cycle, access to food [NUVILAB CR1] and water *ad libitum*) for at least 2 weeks before the experiments. All animal experiments were conducted in accordance with the guidelines for care and use of experimental animals of the National Institutes of Health. The project was approved by the University ethics committee (approval # 2007834). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

### Plant material and standardized extract

Roots of *P. olacoides* Benth (Olacaceae) were collected in Pará (Brazil) (voucher MPEG 108.036, Goeldi Museum, identified by Nelson Rosa), in accordance with national guidelines as they relate to the UN Convention on Biodiversity. POEE preparation and its HPLC (HP 1100/photodiode array detector, Agilent Technologies, with a Zorbax extended C18 column [250 mm  $\times$  4.6 mm, MeOH-H<sub>2</sub>O gradient 10:90–100:0]) fingerprinting are detailed at Siqueira et al. (2007). Due to patent PI0307647-4 INPI/Br and US61/297,442 issues, the nature of active compounds and/or detailed extract composition cannot be currently disclosed.

### Drugs and reagents

Gаланthamine (5 mg/kg), acetylthiocholine iodide (ATC) and mouse anti-GAPDH antibody were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); dimethyl sulfoxide (DMSO) from Quimibrás Reagen (Rio de Janeiro, Brazil); NaCl and paraformaldehyde from Reagen (Brazil); and balsam from Soldan Ltda (Brazil). Mouse anti-AChE antibody (E-19: sc-6432) was acquired from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

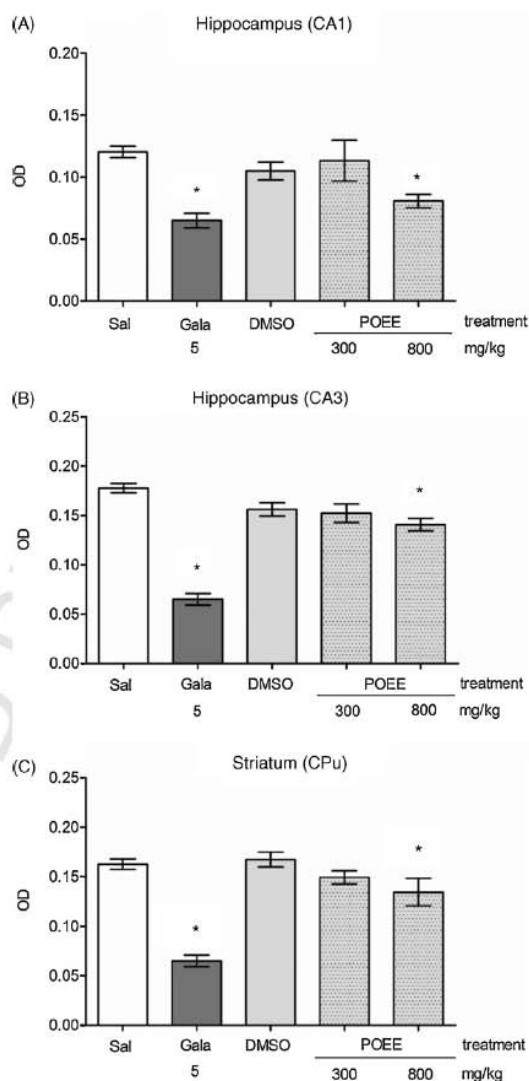


Fig. 1. Effects of POEE on AChE activity in mouse hippocampus CA1 (A), CA3 (B) and striatum (C). SAL = saline; GALA = galanthamine. Optical density (OD) is expressed in pixels. Data are presented as means  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$ ). \* $p < 0.05$  vs. control (DMSO).

### Experimental groups and drug administration

It is noteworthy that 800 mg/kg is the least oral dose found to be promnesic and anti-amnesic in mice, whereas 300 mg/kg displays antidepressive-like but not promnesic properties. In none of these doses usual signs of peripheral anticholinesterase inhibition, such as piloerection, diarrhea or writing was observed. Although desirable, additional doses were not analyzed because we opted for using the very same extract used in the animal models which availability is limited. POEE was dissolved in a 20% DMSO solution. Groups of mice ( $n=5$ ) were treated orally (by gavage) with a single dose of saline, galanthamine (5 mg/kg), DMSO 20%, and POEE (300 or 800 mg/kg). All drugs were given as 0.1 ml/10 g body weight.

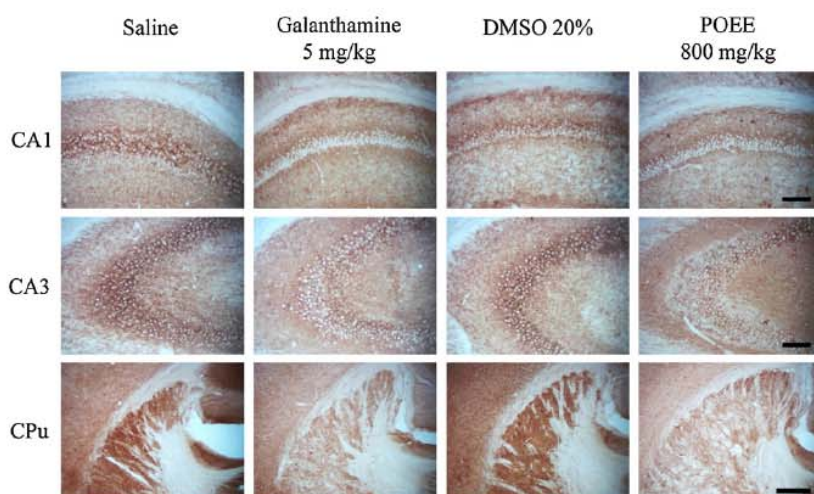


Fig. 2. Representative images of the AChE staining intensity in areas of brain from mice treated with saline, galanthamine, DMSO and POEE. Scale bar: CA1 and CA3 = 100  $\mu$ m; CPu = 300  $\mu$ m.

### AChE histochemistry

#### Brain slices

Ninety minutes after drug administration, under deep anesthesia (i.p. sodium thiopental 60 mg/kg), the animals were transcardially perfused with saline followed by a 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. After complete perfusion (around 15 min to recovery of clear perfusion solution) the brains were removed, post-fixed in the same fixative solution at room temperature for 4 h, and sectioned (coronal sections; 50  $\mu$ m) on a vibratome (Leica, Germany). The sections were collected in PB.

#### Histochemistry

The free-floating sections were carefully washed in 0.1 M tris maleate buffer, pH 6 (TMB) and processed for AChE histochemistry as described by Karnovsky and Roots (1964). Each section was incubated (4 h in the dark at room temperature) in a microplate well filled with 3 ml of the following solution: acetylthiocholine iodide 2.5 mM, TMB, 0.1 M sodium citrate, 30 mM copper sulfate, and 5 mM potassium ferricyanide in distilled water. The expected histochemical products in this reaction are cupric ferrocyanide (Karnovsky's precipitate) and cuprous thiocholine iodide (resulting from the reduction of ferricyanide and cupric ions by thiocholine). Immediately after incubation the sections were rinsed three times in TMB, dehydrated in ethanol, cleared with xylene, and covered with balsam and a coverslip. Analyzed tissues originated from brains from all experimental groups, and the entire procedure was carefully executed to ensure that all sections were submitted to exactly the same histological steps, identical incubation medium and time in order to minimize differences in histochemical reaction or background staining levels.

**Hippocampus** (CA1 and CA3), striatum (caudate putamen, CPu), anterior basolateral amygdaloid nucleus (BLA) and lateral entorhinal cortex (LEnt) were identified in the slices according to the Franklin and Paxinos (1996), with the following coordinates: interaural 2.34 at 1.10 mm, bregma  $-1.46$  at  $-2.70$  mm for CA1/CA3, interaural 2.34 at 1.50 mm, bregma  $-1.46$  at  $-2.30$  mm for CPu, BLA and LEnt. These areas were selected for their relevance to cognition and/or abundant cholinergic afferents. In order to eliminate the subjectivity inherent to qualitative evaluations a semi-automated

quantification method was used where the intensity of the AChE histochemistry is assessed by semi-quantitative densitometric analysis (Xavier et al. 2005; Winkelmann-Duarte et al. 2007), using a Nikon Eclipse E-600 (Japan, Tokyo) microscope coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and the Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, CA, USA). The digitized images from selected areas (left and right sides of the brain) were converted to an 8-bit gray scale (0–255 gray levels), and lighting conditions and magnifications were held constant throughout the analysis. The magnification used for CA1 and CA3 was 100 $\times$ , and 40 $\times$  magnification was used for CPu, BLA and LEnt. The optical density (OD, pixels) was measured in 325.5  $\mu$ m<sup>2</sup> squares delimited in CA1 and CA3 areas, and 8053.9  $\mu$ m<sup>2</sup> squares in the CPu, BLA and LEnt. Selected squares were free from blood vessels or procedure-induced tissue marks. ODs were obtained from at least 40 slices from each animal, with the average OD/area used as individual OD. Investigators were unaware of the source of the slice (experimental groups) being analyzed. The optical density (OD) was calculated using the following formula:

$$OD_{(x,y)} = -\log \left[ \frac{INT_{(x,y)} - BL}{INC - BL} \right]$$

where OD = optical density;  $INT_{(x,y)}$  is the intensity in pixels<sub>(x,y)</sub>; BL is the intensity generated when no light goes through the material; INC is the intensity of the incident light.

### AChE activity

#### AChE isoforms

Ninety minutes after drug administration (as in "Experimental groups and drug administration") mice were sacrificed by decapitation and the hippocampus, frontal cortex and striatum were quickly dissected over ice. The hippocampus, frontal cortex, and striatum were homogenized in 20, 10 and 20 volumes of buffer (0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.2 and 0.16 M sucrose), respectively, and centrifuged at 5000  $\times$  g at 4  $^{\circ}$ C for 15 min (Eppendorf Centrifuge 5415R). The resulting supernatants were used as the G1 source (Das et al. 2001). The pellet was suspended in 1% Triton-X 100 (1%, w/v, in 0.5 M potassium phosphate buffer, pH 7.5) and centrifuged at 100,000  $\times$  g at 4  $^{\circ}$ C in a Hitachi Refrigerated Centrifuge for 60 min.

Please cite this article in press as: Figueiró, M., et al., Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal (Marapuama). Phytomedicine (2010), doi:10.1016/j.phymed.2010.03.009

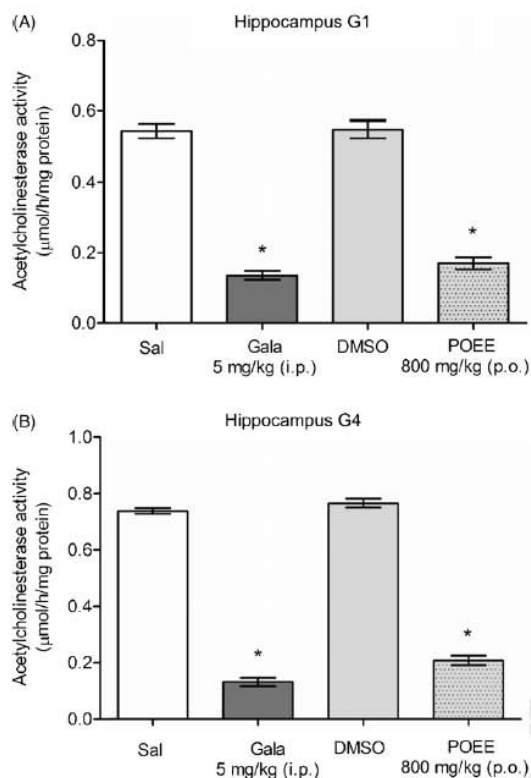


Fig. 3. Effect of POEE *ex vivo* on G1 (A) and G4 (B) AChE isoforms in mouse hippocampus. SAL= saline; GALA= galanthamine. All assays were performed in triplicate. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs. control (DMSO).

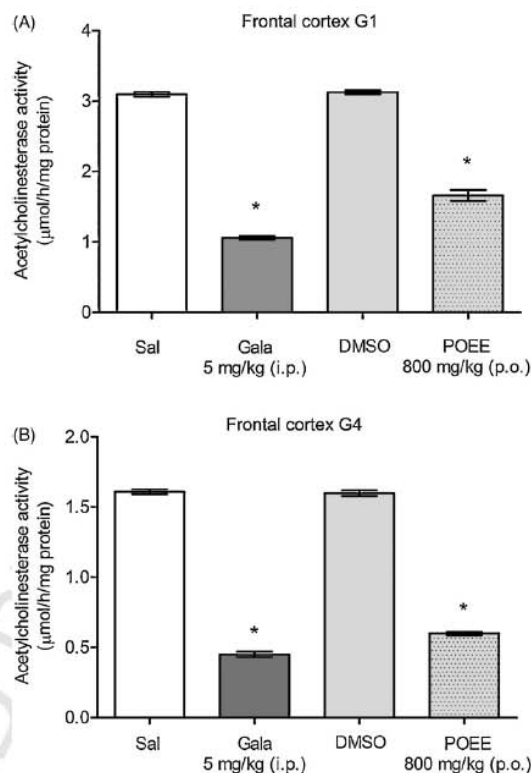


Fig. 4. Effect of POEE *ex vivo* on G1 (A) and G4 (B) AChE isoforms in mouse frontal cortex. SAL= saline; GALA= galanthamine. All assays were performed in triplicate. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs. control (DMSO).

The supernatant was collected and used as the G4 source (Das et al., 2001).

#### AChE activity

AChE activity was determined by adapting the colorimetric method originally described by Ellman et al. (1961). Briefly, 33  $\mu$ l of 10 mM DTNB, 168  $\mu$ l of Tris-HCl buffer, and 33  $\mu$ l of enzymatic material (3  $\mu$ g/ $\mu$ l of protein for G1 or G4 AChE) were added to microplates followed by 33  $\mu$ l of 0.8 mM ATC. The incubation solution contained the butyrylcholinesterase inhibitor tetraisopropyl pyrophosphoramidate (iso-OMPA) at a final concentration of 100  $\mu$ M in order to specifically measure AChE activity. The microplate was read at 415 nm every 30 s for 2.5 min (Microplate Reader Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK). Experiments were performed in triplicate. AChE activities are expressed as  $\mu$ mol of acetylthiocholine hydrolyzed/hour/milligram of protein ( $\mu$ mol ATC/h/mg protein).

#### Western blotting

##### Synaptosomal membrane preparation

Ninety minutes after drug administration (as in "Experimental groups and drug administration") mice were sacrificed by decapitation and the hippocampus and frontal cortex quickly dissected over ice. Percoll-purified synaptosomal membranes from frontal cortex and hippocampus were prepared as previously described (Cunha et al. 1996). Briefly, brain structures were homogenized in a 5% SDS solution containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, São Paulo,

Brazil). The resulting homogenates were centrifuged at 3000  $\times$  g for 10 min at 4  $^{\circ}$ C, the supernatants collected and re-centrifuged at 14,000  $\times$  g for 20 min at 4  $^{\circ}$ C yielding pellets of total membrane. Synaptosomal membrane were prepared by resuspending total membrane pellets in 500  $\mu$ l of a 45% (v/v) Percoll solution in Krebs (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM glucose, pH 7.4), centrifuging at 14,000  $\times$  g for 2 min at 4  $^{\circ}$ C, and washing the top layer (synaptosomal fraction) in 1 ml Krebs solution. For Western blotting analysis, synaptosomal membranes were resuspended in SDS-PAGE buffer, centrifuged at 14,000  $\times$  g for 20 min at 4  $^{\circ}$ C and the resulting pellet corresponding to synaptosomal membranes was once again resuspended in 5% SDS-PAGE buffer for Western blot analysis.

##### AChE immunoreactivity

The acetylcholinesterase immunoreactivity was analyzed in synaptosomal membranes from hippocampus or frontal cortex. Briefly, after determining the amount of protein using the bicinchoninic acid assay with bovine serum albumin (BSA) as standard (Pierce, São Paulo, Brazil), membranes were diluted to a final protein concentration of 2  $\mu$ g/ $\mu$ l in SDS-PAGE buffer; 40  $\mu$ g (20  $\mu$ l) of samples and 20  $\mu$ l of a dual color pre-stained molecular weight standard (Bio-Rad, Porto Alegre, Brazil) were then separated by SDS-PAGE (10% concentrating gel). After electrotransfer, the membranes were incubated overnight with Tris-buffered saline 0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 3% BSA. After blocking with milk, the membranes were incubated for 24 h at 4  $^{\circ}$ C with mouse anti-AChE

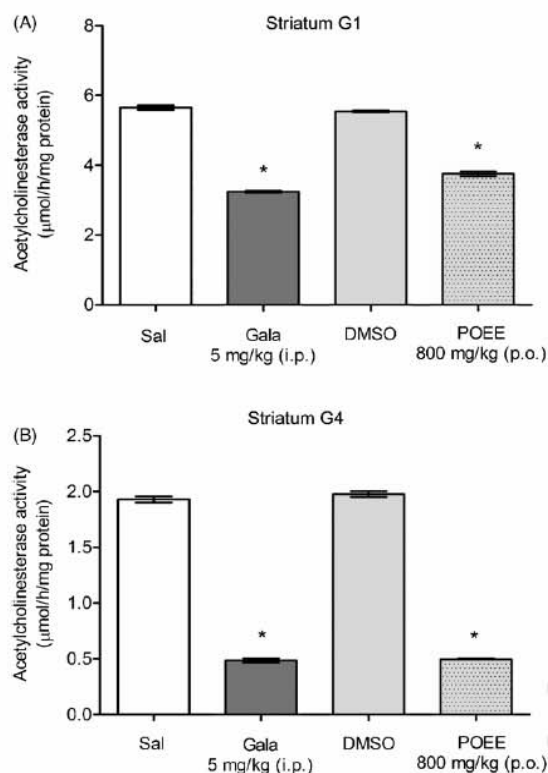


Fig. 5. Effect of POEE *ex vivo* on G1 (A) and G4 (B) AChE isoforms in mouse striatum. SAL = saline; GALA = galanthamine. All assays were performed in triplicate. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs. control (DMSO).

antibody (1:1000 in TBS-T). Following incubation with the primary antibody membranes were washed and incubated with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature before being developed with ECL (Amersham, São Paulo/Brazil). The autoradiographic films were scanned and densitometric analyses were performed using the public domain NIH Image Program (<http://rsb.info.nih.gov/ni-image/>). As an additional control for protein loading, membranes were stained with Ponceau S or mouse anti-GAPDH antibody (1:1000).

#### Protein assay

The protein content was determined as described by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

#### Statistics

The data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. One way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan multiple group comparison was used. In pilot studies, paired Student *t*-test was used to validate methods against positive controls. Significance was set at  $p < 0.05$ .

#### Results

As observed in previous studies, none of the doses of POEE here used induced noticeable signs of toxicity or even of increased GI

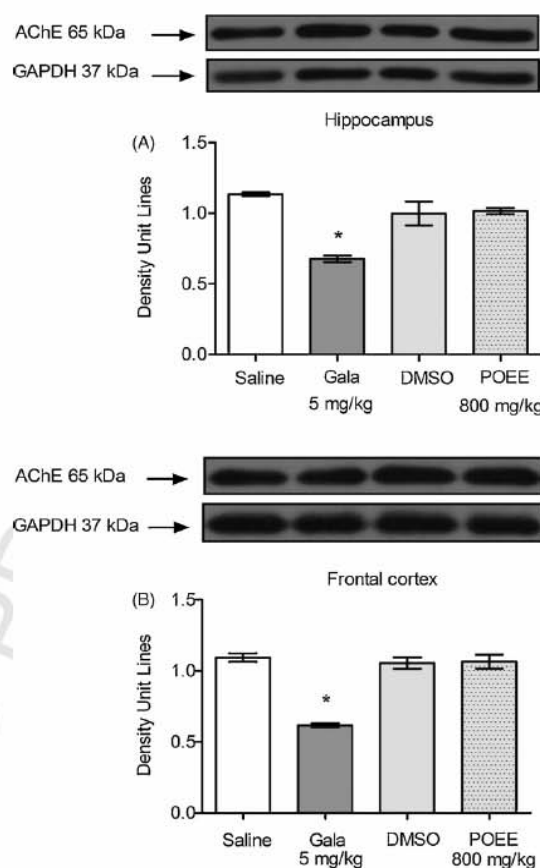


Fig. 6. Western blotting analysis of AChE immunoprotein in synaptosomal fractions from the mouse hippocampus (A) and frontal cortex (B). Bands of the equivalent molecular weights (65 kDa for AChE) are illustrated at the top of each histogram where bars indicate the band quantification from scanned autoradiographic films. Density is expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of five synaptosomal samples from hippocampus and frontal cortex for each treatment group. \* $p < 0.05$  vs. control (saline).

muscarine effects. This came as no surprise since no toxicity was observed in mice treated with this dose of the extract for 21 days (da Silva et al. 2009).

#### Histochemistry

Fig. 1A–C shows the optical density (OD) measurements, which reflect the intensity of AChE histochemistry. Galanthamine significantly decreased ( $p < 0.05$ ) OD in all brain areas (CA1:  $0.060 \pm 0.003$ ; CA3:  $0.063 \pm 0.003$ ; CPu:  $0.064 \pm 0.0025$ ; BLA:  $0.068 \pm 0.001$ ; Lent:  $0.06 \pm 0.001$ ) as compared to saline (CA1:  $0.12 \pm 0.005$ ; CA3:  $0.17 \pm 0.005$ ; CPu:  $0.16 \pm 0.005$ ; BLA:  $0.11 \pm 0.008$ ; Lent:  $0.10 \pm 0.012$ ) [CA1:  $t(4) = 17.4$ ; CA3:  $t(4) = 29.0$ ; CPu:  $t(4) = 18.8$ ; BLA:  $t(4) = 5.7$ ; Lent:  $t(4) = 2.34$ , respectively]; DMSO was devoid of effect ( $p > 0.05$ ). POEE 800 mg/kg (but not 300 mg/kg) significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the density of AChE staining (decreased OD) in CA1 ( $0.08 \pm 0.01$ ), CA3 ( $0.14 \pm 0.01$ ), and CPu ( $0.13 \pm 0.01$ ), as compared to DMSO (CA1:  $0.10 \pm 0.01$ ; CA3:  $0.17 \pm 0.01$ ; and CPu:  $0.17 \pm 0.01$ ; ( $F_{(4,20)} = 7.38$ ;  $F_{(4,20)} = 48.06$ ;  $F_{(4,20)} = 27.59$ , respectively). AChE inhibition corresponded to 33, 20 and 17% in CA1, CA3 and CPu, respectively. No significant differences ( $p > 0.05$ ) induced

by 300 or 800 mg/kg were found in BLA and LEnt [ $F_{(4,20)} = 2.2$ ;  $F_{(4,20)} = 1.5$ , respectively] (data not shown).

Representative images of POEE-induced AChE inhibition at hippocampus (CA1 and CA3) and striatum (CPU) can be seen in Fig. 2.

### Biochemistry

Figs. 3A and B, 4A and B, and 5A and B show the effects of POEE (800 mg/kg) on AChE G1 and G4 activities in the hippocampus, frontal cortex and striatum, respectively. The experimental conditions were validated with galanthamine (5 mg/kg), which inhibited ( $p < 0.05$ ) G1 and G4 in all tissues; DMSO was devoid of effect ( $p > 0.05$ ). POEE significantly inhibited G1 in hippocampus [ $F_{(3,19)} = 145.8$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 3A], frontal cortex [ $F_{(3,23)} = 499.6$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 4A], and striatum [ $F_{(3,19)} = 596.3$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 5A]. G4 activity was also significantly reduced in hippocampus [ $F_{(3,19)} = 550.7$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 3B], frontal cortex [ $F_{(3,19)} = 1360$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 4B] and striatum [ $F_{(3,19)} = 1559$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 5B]. POEE appeared to preferentially affect G1 and G4 in hippocampus (66 and 72% inhibition, respectively) and frontal cortex (50 and 63% inhibition, respectively), while G4 appeared to be more markedly affected in the striatum (72% inhibition).

### Western blotting

Fig. 6A and B shows the effects of POEE on the AChE immunocontent in synaptosomal membranes from the hippocampus and frontal cortex. The experimental conditions were validated with galanthamine (5 mg/kg), which significantly ( $p < 0.05$ ) diminished the AChE immunocontent in the hippocampus and frontal cortex; DMSO was devoid of effect ( $p > 0.05$ ). No significant changes were induced by POEE (800 mg/kg) in hippocampus and frontal cortex synaptosomal membranes [ $F_{(3,16)} = 18.38$ ;  $F_{(3,16)} = 39.82$ ;  $p > 0.05$ , respectively].

### Discussion

The main contribution of this study is the conclusive proof that the anticholinesterase compound(s) present in a POEE dose that facilitates memory (da Silva et al. 2004, 2007, 2008) and reverses amnesias (da Silva et al. 2009) is (are) orally effective and crosses the BBB, leading to significant AChE inhibition in cognition-relevant brain areas. Enzyme histochemistry is an appropriate link between biochemistry and morphology since it measures the biotransformation of a substrate by a tissue enzyme in its orthotopic localization (Meier-Ruge and Bruder 2008). Complementing the study done with intraperitoneal administration to older (14 months) mice (Siqueira et al. 2003), we here show histochemically that AChE activity is inhibited (by about 33% in hippocampus CA1, 20% in hippocampus CA3, and 17% in the striatum) in adult mice treated orally only with the dose also found to facilitate memory.

In agreement with the *in vivo* histochemistry data, G1 and G4 AChE isoforms activities were found to be markedly inhibited in routine Ellman's neurochemical analysis. The observed levels of inhibition are comparable to or greater than those reported for donepezil and rivastigmine (30–46%) by using the same analytical method (Kosasa et al. 1999). Nevertheless, one has to bear in mind that active doses/concentrations of the extract are likely to be dramatically diminished with further purification of active compound(s). Western blotting did not detect changes in the AChE immunocontent in the studied areas, suggesting that POEE has no significant effects on the amounts of enzyme present in these tissues; chronic studies would be nevertheless necessary to confirm this proposition.

Although deficits in cholinergic neurotransmission are likely to be one of the several factors contributing to the cognitive malfunc-

tion perceived in AD (Perry et al. 2001), a decline in cholinergic function in patients with this disease has been demonstrated in specific brain areas relevant for cognition (Coyle et al. 1983; Whitehouse et al. 1981). An increased G1/G4 ratio is thought to exist in the brains of AD patients, which raises the issue of preferential isoform inhibition for an optimum AChEI in treating AD (Siek et al. 1990; Schegg et al. 1992). The *in vivo* inhibition pattern shown here is supportive of a selective action on hippocampus G1, striatum and frontal cortex G4.

Interestingly, AChE was not inhibited in other ACh-rich areas, such as the anterior basolateral amygdaloid nucleus and lateral entorhinal cortex. It is arguable that differences in lipid abundance in different brain areas could influence regional distribution of very lipophilic compounds (Pardridge 2007), or that increased rates of AChE turnover in brain areas highly active in cognition could influence the access of AChE inhibitory compounds to susceptible states of AChE (Michalek et al. 1990). Basal forebrain cholinergic neurons project their axons to the cerebral cortex, striatum, amygdala, and hippocampus (Whitehouse et al. 1982; Amaral and Witter 1989), where they release acetylcholine to mediate attention, learning and memory (Sarter and Parikh 2005). In rodents, spatial learning and memory are closely related to the function of the dorsal hippocampus (Moser et al. 1993), to which cholinergic neurotransmission contributes significantly (Bartus 2000). Although especially prominent in AD, cholinergic deficits in the cortex and hippocampus occur during normal human ageing (Colom 2006), and smaller numbers of neurons and atrophy of surviving cholinergic neurons in the basal forebrain were shown in aged animals with impaired learning and memory (Muir 1997). The pattern of inhibition here demonstrated for POEE is therefore compatible with its ability to counteract amnesias induced by scopolamine and ageing (da Silva et al. 2004, 2009). The data in line with those arguing on the advantages in developing anticholinesterase compounds with region- and isoform-specific activity to improve on currently available treatments for cognitive deficits in general, and AD in particular (Zhao and Tang 2002).

Several aspects of POEE effects suggest its potential in the treatment of neurodegenerative disorders associated with cholinergic deficits, including: the ability to reverse amnesias (by ageing, scopolamine or MK-801) (da Silva et al. 2004, 2009), the characteristics of its anticholinesterasic properties (selectivity for central cholinesterases, isoform selectivity and an apparent regional selectivity for brain areas most salient for cognition), as well as marked antioxidant (Siqueira et al. 2007) and neuroprotective (Siqueira et al. 2004) properties. Given the huge impediment in drug access to the CNS, the body of experimental evidence generated with this extract, combined with the agreeing claims by native users, reinforces the need to fully characterize the safety and efficacy of extract and/or its isolated compounds by adequate clinical assessments.

### Acknowledgements

The authors acknowledge the excellent technical assistance of Marina Comachio in all biochemical analysis. The authors are grateful to CNPq for fellowships. This study is associated with/protected by patents no. PI0307647-4 INPI/Br and US61/297,442.

### References

- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591.
- Anekonda, T.S., Reddy, P.H., 2005. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.* 50, 361–376.
- Barnes, C.A., Meltzer, J., Houston, F., Or, G., McGann, K., Wenk, G.L., 2000. Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience* 99, 17–23.

- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408–417.
- Bartus, R.T., 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163, 495–529.
- Birks, J., Flicker, L., 2006. Donepezil for mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* 19 (3), CD006104.
- Colom, L.V., 2006. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 96, 609–623.
- Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M.R., 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219 (4589), 1184–1190.
- Cunha, R.A., Johansson, B., Constantino, M.D., Sebastião, A.M., Fredholm, B.B., 1996. Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [3H]CGS 21680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal A2A receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353, 261–271.
- da Silva, A.L., Piato, A.L., Bardini, S., Netto, C.A., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2004. Memory retrieval improvement by *Psychopetalum olacoides* in young and aging mice. *J. Ethnopharmacol.* 95, 199–203.
- da Silva, A.L., Piato, A.L., Ferreira, J.G., Martins, B.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2007. Promnesic effects of *Psychopetalum olacoides* in aversive and non-aversive learning paradigms. *J. Ethnopharmacol.* 109, 449–457.
- da Silva, A.L., Ferreira, J.G., da Silva Martins, B., Oliveira, S., Mai, N., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2008. Serotonin receptors contribute to the promnesic effects of *P. olacoides* (Marapuama). *Physiol. Behav.* 95 (1–2), 88–92.
- da Silva, A.L., Silva Martins, B., Linck, V., de M., Herrmann, A.P., Mai, N., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2009. MK801- and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a "brain tonic". *Psychopharmacology* 202 (1–3), 165–172.
- Das, A., Dikshit, M., Nath, C., 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 68, 1545–1555.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andre Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 27–30.
- Elisabetsky, E., Siqueira, I.R., 1998. Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? In: Prendergast, H.D., Etkin, N., Harris, D.R., Houghton, P.J. (Eds.), *Plants for Food and Medicine*. Royal Botanic Gardens, Kew, London, pp. 373–385.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 137–147.
- Francotte, P., Graindorge, E., Boverie, S., de Tullio, P., Pirotte, B., 2004. New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 11, 1757–1778.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G.T., 1996. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Karnovsky, M.J., Roots, L., 1964. A "direct-coloring" thiocoline method for cholinesterases. *12, 219–221.*
- Kobasa, T., Kuriya, Y., Matsui, K., Yamanishi, Y., 1999. Inhibitory effects of donepezil hydrochloride (E2020) on cholinesterase activity in brain and peripheral tissues of young and aged rats. *Eur. J. Pharmacol.* 386 (1), 7–13.
- Lane, R.M., Kivipelto, M., Greig, N.H., 2004. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin. Neuropharmacol.* 27, 141–149.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Meier-Ruge, W.A., Bruder, E., 2008. Current concepts of enzyme histochemistry in modern pathology. *Pathobiology* 75, 233–243.
- Michalek, H., Fortuna, S., Volpe, M.T., Pintor, A., 1990. Age-related differences in the recovery rate of brain cholinesterases, choline acetyltransferase and muscarinic acetylcholine receptor sites after a subacute intoxication of rats with the anticholinesterase agent, isofluorophate. *Acta Neurobiol. Exp.* 50, 237–249.
- Moser, E., Moser, M.B., Andersen, P., 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* 13, 3916–3925.
- Muir, J.L., 1997. Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56 (4), 687–696.
- Pardridge, W.M., 2007. Drug targeting to the brain. *Pharm. Res.* 24 (9), 1733–1744.
- Pardridge, W.M., 2009. Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimers Dement.* 5 (5), 427–432.
- Perry, E.K., Martín-Ruiz, C.M., Court, J.A., 2001. Nicotinic receptor subtypes in human brain related to aging and dementia. *Alcohol* 24 (2), 63–68.
- Piato, A.L., Detanico, B.C., Jesus, J.F., Lhullier, F.L.R., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2008. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties. *J. Ethnopharmacol.* 118 (2), 300–304.
- Sarter, M., Parikh, V., 2005. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 48–56.
- Schegg, K.M., Harrington, L.S., Neilsen, S., Zweig, R.M., Peacock, J.H., 1992. Soluble and membrane-bound forms of brain acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13, 697–704.
- Schliebs, R., Arendt, T., 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 113, 1625–1644.
- Siek, G.C., Katz, L.S., Fishman, E.B., Korosi, T.S., Marquis, J.K., 1990. Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biol. Psychiatry* 27, 573–580.
- Siqueira, I.R., Fochesatto, C., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Battastini, A.M., Netto, C.A., Elisabetsky, E., 2003. *Psychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 645–650.
- Siqueira, I.R., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Nunes, D.S., Salbego, C., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2004. Neuroprotective effects of *Psychopetalum olacoides* Benth (Olaaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sci.* 75 (15), 1897–1906.
- Siqueira, I.R., Fochesatto, C., Torres, I.L.S., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2007. Antioxidant activities of *Psychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. *Phytomedicine* 14 (11), 763–769.
- Sonkusare, S.K., Kaul, C.L., Ramarao, P., 2005. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope. *Pharmacol. Res.* 51, 1–17.
- Van Marum, R.J., 2008. Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22 (3), 265–274.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T., DeLong, M.R., 1981. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10 (2), 122–126.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., DeLong, M.R., 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215, 1237–1239.
- Winkelmann-Duarte, E.C., Todeschin, A.S., Fernandes, M.C., Bittencourt, L.C., Pereira, G.A., Samios, V.N., Schuh, A.F., Achaval, M.E., Xavier, L.L., Sanvitto, G.L., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Lucion, A.B., 2007. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Res.* 19, 20–30.
- Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 16, 58–64.
- Zhao, Q., Tang, X.C., 2002. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *Eur. J. Pharmacol.* 455, 101–107.

**3.1.3.** Micheli Figueiró; Jocemar Ilha; Viviane Linck; Ana Paula Herrmann; Patrícia Nardin; Camila Braz; Matilde Achaval; Carlos Alberto Gonçalves; Lisiane O. Porciúncula; Domingos S. Nunes; Elaine Elisabetsky. **The amazonian herbal Marapuama attenuates memory impairment and neuroglial degeneration in a mouse Alzheimer model. Artigo submetido ao Journal of Ethnopharmacology (Submetido em 18/03/2010; JEP-D-10-00537).**



**THE AMAZONIAN HERBAL MARAPUAMA ATTENUATES COGNITIVE IMPAIRMENT AND NEUROGLIAL DEGENERATION IN A MOUSE ALZHEIMER MODEL**

**Micheli Figueiró<sup>a,b</sup>, Jocemar Ilha<sup>b,e</sup>, Viviane M. Linck<sup>a,c</sup>, Ana P. Herrmann<sup>a,c</sup>, Patrícia Nardin<sup>c</sup>, Camila B. Menezes<sup>a</sup>, Matilde Achaval<sup>b,e</sup>, Carlos Alberto Gonçalves<sup>c</sup>, Lisiane O. Porciúncula<sup>c,d</sup>, Domingos S. Nunes<sup>f</sup>, Elaine Elisabetsky<sup>a,b,c</sup>.**

<sup>a</sup>Laboratório de Etnofarmacologia; <sup>b</sup>PPG-Neurociências; <sup>c</sup>PPG-Bioquímica, <sup>d</sup>Laboratório de Estudos sobre o Sistema Purinérgico; <sup>e</sup>Laboratório de Histofisiologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>f</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas, Bloco M, Ponta Grossa, PR, Brazil.

**\*Corresponding author:** Micheli Figueiró, Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3308-3137, Fax: +55 51 3308-3121.

E-mail address: micheli.figueiro@gmail.com

**Key words:** *Ptychopetalum olacoides*, neuroprotection, dementia

**Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is expected to affect more than 22 million people worldwide by 2025, causing devastating suffering and enormous costs to families and society. AD is a multifactorial disease, with a complex pathological mosaic. In rodents, AD-like dementia can be induced by cerebral microinjection of A $\beta$  peptide, leading to amyloid deposits, amnesia and various features of neurodegeneration. Marapuama (*Ptychopetalum olacoides*) is regarded as a "brain tonic" in the Amazon region and shows a nootropic profile in rodents. ***Aim of the study:*** Because a specific extract (POEE) of Marapuama was shown to possess promnesic and anti-amnesic properties, the aim of this study was to verify if POEE is also effective against A $\beta_{1-42}$ -induced cognitive deficit in mice. Additionally, A $\beta$  deposits (Congo red), GFAP expression (immunohistochemistry), and neurodegenerative changes in the hippocampal pyramidal layer (Nissl) were examined as measures of A $\beta_{1-42}$ -induced neurodegeneration. ***Materials and Methods:*** CF1 mice were subjected to the experimental Alzheimer model with the A $\beta_{1-42}$  i.c.v. administration. The effects of POEE 800 mg/kg were evaluated over 14 consecutive days of treatment. ***Results:*** The data show that 14 days of oral treatment with POEE (800 mg/kg) was effective in preventing A $\beta$ -induced memory impairment, with parallel reductions in A $\beta$  deposits and astrogliosis. CA1 hippocampus loss induced by A $\beta_{1-42}$  was also diminished in POEE-treated mice. ***Conclusion:*** This study offers evidence of functional and neuroprotective effects of two weeks treatment with a *Ptychopetalum olacoides* extract against A $\beta$  peptide-induced neurotoxicity in mice. Given the multifactorial nature of neurodegeneration, the considerable potential for an AChE inhibitor displaying associated neuroprotective properties such as here reported warrants further clinic evaluation.

## 1. Introduction

With a rapidly aging population in the developed world, and a sharp increase in life expectancy in the developing world, Alzheimer's disease (AD) is now a global concern (Pimplikar, 2009). Neurologically, AD is an age-associated neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory and cognition (Probst et al., 1991). Pathologically, the disease is characterized by the presence of extra- (Rauk, 2009) and intracellular (Knobloch et al., 2007; LaFerla et al., 2007) plaques of  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ), and intracellular tangles of hyperphosphorylated tau protein (Ballatore et al., 2007). How exactly these pathological hallmarks lead to loss of forebrain cholinergic neurons and a pronounced fall in acetylcholine levels (Auld et al., 2002), resulting in devastating cognitive impairment, remains to be completely clarified (Pimplikar, 2009). In fact, in animal models and humans alike, the association between plaque density and the degree of cognitive deficits is not always clear cut (Caughey and Lansbury, 2003).

Because cholinergic pathways are crucial for cognition and very sensitive to amyloid toxicity (Emre et al., 1992), acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) are the mainstream treatment for the initial and moderate stages of AD, in an attempt to maintain adequate levels of cholinergic receptor stimulation (Giacobini, 2000). Marapuama (*Ptychopetalum olacoides* Bentham, PO) is a medicinal plant favored by the elderly in Amazonian communities, and is used as what has now become categorized as a nootropic. We have reported that a specific Marapuama extract (POEE) possesses promnesic (da Silva et al., 2004, 2007, 2008), anti-amnesic (da Silva et al., 2009), neuroprotective (Siqueira et al., 2004) and anticholinesterase (Siqueira et al., 2003; Figueiró et al., 2010) The aim of this study was to verify if POEE is also able to counteract the effects of  $A\beta_{1-42}$  injection in mice.

In rodents, cerebral microinjection of  $A\beta$  leads to extracellular amyloid deposits, causes amnesia (Harkany et al., 1999; Hardy and Selkoe, 2002), increases gliosis as reflected

in increased GFAP (astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein) expression (Van Eldik, 2001), and induces neuronal loss (Wang et al., 2001). In this study memory was evaluated by the step-down inhibitory avoidance task, while the progression of A $\beta$ <sub>1-42</sub>-provoked degeneration was assessed by measuring the extent of A $\beta$  deposits (Congo red), GFAP expression (immunohistochemistry), and neurodegenerative changes in the hippocampal pyramidal layer (Nissl). Additionally, BDNF levels were measured (immunoassay) in the hippocampus. Adding to its nootropic profile in adult and ageing mouse memory models, we here show that a 14-day treatment with Marapuama (POEE extract) effectively diminished both A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced cognitive impairment and neurodegeneration.

## **2. Material and methods**

**2.1. *Animals:*** Male (CF1) adult (30 days old, 35–45 g) albino mice were obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Animals were maintained for 15 days in our own animal facility, under controlled environmental conditions (22±1 °C, 12 h-light/dark cycle, free access to food [NUVILAB CR1] and water) before the beginning of the experiments. All animal experiments were conducted in accordance with the guidelines for care and use of experimental animals contained in the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The project was approved (# 2007834, 2008) by the University ethics committee.

**2.2. *Plant material and standardized extract:*** In accordance with Brazilian guidelines associated with the UN Biodiversity Convention, PO roots were collected, and subsequently identified by Nelson Rosa, near Rio Capim (Pará State, Brazil). A voucher specimen (GM108.036) is deposited at the Goeldi Museum Herbarium. POEE (ethanol extract) preparation and its HPLC (HP 1100/photodiode array detector, Agilent Technologies, with a Zorbax extended C18 column [250 x 4.6 mm, MeOH-H<sub>2</sub>O gradient 10:90–100:0])

fingerprinting are detailed elsewhere (Siqueira et al., 2007). The nature of the active compounds and/or detailed extract composition cannot be disclosed due to patent issues (PI0307647-4, INPI/Br; US61297442).

**2.3. Drugs and reagents:**  $\beta$ -amyloid (1-42) peptide fragment ( $A\beta_{1-42}$ ) was acquired from American Peptide (CA, USA), Promega BDNF Emax ImmunoAssay System from Promega Co. (Madison, WI, USA), the polyclonal anti-GFAP antibody from Dako (Carpinteria, CA, USA) and Congo red from Sigma (St. Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was acquired from Quimibrás Reagen (Brazil), and NaCl from Reagen (Brazil).

POEE was dissolved in DMSO to obtain a final concentration of 80 mg/mL in a DMSO 20% (v/v) solution. Oral treatments were done by gavage, with a fixed volume of 0.1 mL/10 g.

The peptide was prepared as a 500  $\mu$ M stock solution in sterile 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4), and aliquots stored at -20 °C. Intracerebroventricular (i.c.v.) administration is detailed in 2.4.1.

**2.4. Experimental design:** Immediately after PBS or  $A\beta_{1-42}$  i.c.v. administration, six groups of mice (N=12) were orally treated once a day for 14 consecutive days with saline (NaCl 0.9 g%), DMSO (20%), or POEE (800 mg/kg). The oral dose of 800 mg/kg was chosen because it significantly reverses amnesias (da Silva et al., 2009) and was shown to increase acetylcholine in relevant brain areas of mice (Figueiró et al., 2010). Memory (inhibitory avoidance test session) was assessed 24 h after treatments; the brains obtained immediately after test sessions were used to assess hippocampal BDNF levels,  $A\beta$  deposits, GFAP expression and neuronal death.

Additional doses, although desirable, were precluded due to the limited amount of the very same batch of extract with which the anti-amnesic effects (aging, MK-801 and scopolamine; da Silva et al 2004, 2009) had been characterized.

**2.4.1.  $A\beta_{1-42}$  intracerebroventricular administration:**  $A\beta_{1-42}$  was administered according to Laursen and Belknap (1986) and Prediger et al. (2007). Pilot experiments were performed with  $A\beta_{1-42}$  at 400 and 800 pmol and 2 nmol, as well as  $A\beta_{42-1}$ . Memory deficits were seen with  $A\beta_{1-42}$  400 and 800 pmol and were absent with  $A\beta_{1-42}$  2 nmol or  $A\beta_{42-1}$ . The 400 pmol/mouse protocol adopted has been used elsewhere (Yan et al., 2001; Kim et al., 2004) with comparable results.

PBS and/or  $A\beta_{1-42}$  were administered unilaterally using a 27-gauge microsyringe (Hamilton) with a 4.0 mm stainless-steel needle. The needle was inserted (perpendicular to the skull) 1 mm to the right of the midline, at an equal distance between the eye and the ear; the injection volume (4  $\mu$ L) was delivered gradually (10 s). Mice were returned to their home cage immediately after the administration; no abnormal behavior was observed within 1 min after administration. The needle track (stained with methylene blue) was verified immediately before brain dissection to check for accuracy (less than 10% of the treated animals were discarded).

**2.4.2. Step-down inhibitory avoidance:** The step-down inhibitory avoidance used here was adapted from Netto and Izquierdo (1985) and Maurice et al. (1994). On the 14<sup>th</sup> and last day of treatment, at least 4 h after treatments, mice were transferred to the dim-lighted experimental room and habituated for at least 60 min before the experiments. The inhibitory avoidance apparatus was a plastic box (30  $\times$  30  $\times$  40 cm), with a fixed platform (5  $\times$  5  $\times$  4 cm) in the center of the grid floor. Each mouse was placed on the platform and the latency to step down (four paws on the grid) was automatically recorded in the training and test sessions. In the training session, mice received a scrambled foot shock (0.3 mA for 15 s) upon stepping down. The test session was performed 24 h later (long-term memory – LTM) with the same procedure, except that no shock was administered after stepping down; an upper cut-off time

of 300 s was set. Differences in test and training latencies were considered as a measure of memory.

Locomotion was evaluated 24 h before the inhibitory avoidance, again at least 4 h after drug administration. The number of crossings was automatically recorded in activity cages (45 × 25 × 20 cm, Albarsch Electronic Equipment, Brazil), equipped with four parallel photocells (Creese et al., 1976). Mice were individually placed in the activity cages and the crossings were recorded for 8 min (the final 5 min considered as a measure of locomotion).

**2.4.3. Hippocampal BDNF levels:** BDNF levels were measured with the Promega BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega Co., Madison, WI, USA), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, immediately after the test sessions mice were sacrificed by decapitation, the hippocampus of each animal (n=6) was quickly dissected over ice and individually homogenized in lysis buffer [containing, in mM: 137 NaCl, 20 Tris-HCl (pH 8.0), Igepal (1%), glycerol (10%), 1 PMSF, 0.5 sodium vanadate, 0.1 EDTA and 0.1 EGTA], then centrifuged at 14,000 rpm (4 °C, 3 min). The supernatants were diluted in sample buffer and incubated on 96-well flat-bottom plates previously coated with mouse monoclonal anti-BDNF (1:1000). After blocking with Promega 1 × block and sample buffer, plates were incubated with polyclonal anti-mouse antibody for 2 h, and horseradish peroxidase for an additional hour. The color reaction with tetramethyl benzidine was quantified at 450 nm in a plate reader (Microplate Reader Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK). A standard BDNF curve was constructed ranging from 0-500 pg/mL. Total protein concentration was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard (Lowry et al., 1951).

**2.4.4. Preparation of brain slices for histological analysis:** Immediately after the step-down test sessions 6 mice from each treatment group were transcardially perfused (under deep anesthesia with ketamine/xylazine 100/10 mg/mL i.p.) with saline (circa 15 min until recovery

of clear perfusion solution) followed by 4% paraformaldehyde (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). After complete perfusion the brains were removed and post-fixed for 4 h at room temperature in plastic containers filled with the same fixative solution; for cryoprotection the fixed brains were immersed in 15% sucrose (in phosphate buffer at room temperature) for 24 h, followed by 30% sucrose for another 24 h, and stored at -70 °C until further use. Coronal sections (20 µm) were cut from the brains on a cryostat (Leitz, Germany), and the sections were collected in phosphate-buffered saline (PBS) in 24-well plates (3 mL/plate) for Congo red and Nissl staining, and GFAP-immunohistochemistry. The hippocampus (CA1) was identified in the slices according to the Franklin and Paxinos Atlas (1996), with the following coordinates: interaural 2.34 to 1.10 mm, and bregma -1.46 to -2.70 mm.

**2.4.5. *Aβ deposits:*** Modified Highman's Congo red stain was used to identify amyloid deposits in the brain sections. Briefly, brain sections mounted on slides were submitted to the following staining steps: hydrated in water (5 min), stained in Congo red solution (0.5% in 50% ethanol) for 15-20 min, rinsed in distilled water, quickly differentiated (5-10 dips) in alkaline alcohol solution, rinsed in tap water (1 min), counterstained with Gill's hematoxylin (30 s), rinsed in tap water (2 min), dehydrated with 95% and 100% ethanol, cleared in xylene and finally covered with balsam and a coverslip. Using this protocol amyloid deposits are stained red while the nuclei are blue. Sections from 5 mice from each treatment group were examined by two independent observers blind to treatments, and scored according to the following scale: (0) deposits are absent, (1) deposits are obvious but scarce, and (2) deposits are obvious, and (3) deposits are obvious and abundant. The median score was used for each animal.

**2.4.6. *Hippocampal astrocytosis:*** GFAP expression was used as a measure of astrocytosis in hippocampal sections. Brain sections were treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, followed by preincubation with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS plus 0.3% Triton X-100 for 30



min, and incubation with rabbit polyclonal anti-GFAP (1:200 in PBS–Triton X-100) for 48 h at 4 °C. After several PBS washes, sections were incubated with a rabbit PAP-conjugated anti-rabbit IgG (1:100 in PBS) for 2 h at room temperature. The immunohistochemical reaction was revealed by incubating the sections for 10 min in 0.06% 3,3-diaminobenzidine (DAB) dissolved in PBS and in the same solution containing 1  $\mu$ L of 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per mL of DAB medium for an additional 10 min. Sections were then rinsed with PBS, dehydrated with ethanol, cleared with xylene, and covered with balsam and coverslips. Control sections were prepared by omitting the primary antibody and replacing it with PBS. The brain sections were fixed and post fixed for the exact same periods in identical solutions, were processed in a rigorously identical manner at all steps, and incubated in identical media for the same period of time. These measures were taken to avoid overreaction, differences in chromogen reaction, saturation of optical density, and changes in background levels. In the stratum radiatum (R) of the hippocampal CA1 region (a particularly glia-rich area), the optical density of GFAP-immunoreactive cells was evaluated semi-quantitatively by densitometry as previously described (Xavier et al., 2005). Images were captured using a Nikon Eclipse E-600 (20 x; Tokyo, Japan) microscope coupled to a digital camera and analyzed with the Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, CA, USA).

**2.4.7 Neurodegeneration in the hippocampal CA1 pyramidal layer:** Nissl's stain was used to determine the width of the hippocampal pyramidal layer. Briefly, brain sections mounted on slides were hydrated in water before immersion in 0.5% cresyl violet solution (60 °C, 5 min), differentiated in 95% ethyl alcohol in acetic acid (20 min) and dehydrated in 95% and 100% ethyl alcohol, cleared in xylene and covered with balsam and a coverslip. Images of the hippocampal CA1 pyramidal layer (Py) were captured and digitalized (20x) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Tokyo, Japan) coupled to a digital camera, then analyzed using Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). For each mouse, five coronal slices

(both sides, 10 images/animal) of hippocampal CA1 were used to measure the width of the pyramidal layer. For each image (with no further processing) three measurements were taken: one at the center of the image, one  $\sim 80 \mu\text{m}$  to the right of center and one  $\sim 80 \mu\text{m}$  to the left; for each animal the width Py was the mean of the 10 image measurements.

**2.8. Statistical analysis:** Results from the step-down test are expressed as medians [interquartile ranges], and were analyzed by Kruskal–Wallis/ Mann–Whitney *U*-test (two-tailed); training/test latency differences within treatment groups were evaluated by Wilcoxon. Scores for A $\beta$  deposits are expressed as mean  $\pm$  S.E.M., and analyzed by Kruskal–Wallis/Mann–Whitney. Data for locomotion, BDNF, GFAP and Py are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, and analyzed by one-way ANOVA/Duncan. Significance was set at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

**3.1. Step-down memory:** The A $\beta_{1-42}$  and POEE doses used in the experiment did not affect locomotion ( $F_{(5,65)} = 1.896$ ,  $P > 0.05$ , data not shown). As illustrated in Figure 1, and confirming that learning and memory took place with the training paradigm used in this study, there were significant and consistent differences ( $P < 0.05$ ) between training and test session latencies in the controls (saline and DMSO) and POEE groups; while A $\beta_{1-42}$  caused complete amnesia (no differences between training/test session latencies) in saline- and DMSO- treated groups, the difference between training and test sessions in the A $\beta_{1-42}$ +POEE treated group was equal to that in POEE mice not treated with the amyloid peptide.

**3.2. BDNF levels:** No significant changes were observed in hippocampal BDNF levels among the various groups (Figure 2).

**3.3. A $\beta$  deposits:** As can be seen from the panel in Figure 3, while amyloid deposits are obvious and abundant in the CA1 region of the hippocampus of mice treated with i.c.v. A $\beta_{1-42}$ , deposits are scarce in mice treated with POEE (Figure 3). Kruskal-Wallis revealed a

significant treatment effect ( $H(6) = 24.88, P < 0.05$ ), while the POEE-treated group exhibited significantly fewer A $\beta$  deposits ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney) than controls (Figure 3).

**3.4. Astrocytosis:** As shown in the histogram in Figure 4, GFAP expression was significantly increased ( $F_{(5,29)}=12.39$ ) in the hippocampus of A $\beta_{1-42}$ -treated mice, regardless of treatment; nevertheless, the increase was significantly ( $P < 0.05$ ) attenuated in the POEE-treated group in comparison with saline or DMSO treatments. The panel shows representative images that illustrate the attenuating effect of POEE on the A $\beta_{1-42}$ -induced astrocytosis.

**3.5. Hippocampal CA1 pyramidal layer:** Figure 5 shows the morphometrical analysis of Nissl stained CA1 hippocampus sections. As can be seen in the representative images in the panel, treatment with A $\beta_{1-42}$  leads to a discrete but significant reduction ( $F_{(5,29)} = 4.241, P < 0.05$ ) in the width of the pyramidal cell layer in the control groups, a degenerative change absent in the POEE-treated group.

#### 4. Discussion:

The main finding of this study is that 14 days of treatment with a *P. olacoides* extract (POEE) was effective in preventing A $\beta$ -induced cognitive impairment as well as CA1 loss in mice, with parallel reductions in A $\beta$  deposits and gliosis. Even though none of the available animal models reproduces the complete pathologic array of AD (Radde et al., 2008), impaired cognition and aspects of AD-like neurodegeneration have been shown in i.c.v. A $\beta$ -treated mice as well as various transgenic strains (Nitta et al., 1997; Billings et al., 2005; Oakley et al., 2006; Dong et al., 2007). A $\beta$ -induced toxicity resulting in neurotransmitter deficits and synaptic dysfunction is thought to involve oxidative damage, neuroinflammation, activation of various kinases, and increased apoptosis (Masliah et al., 2006). Since the mainstream treatment for symptomatic AD still relies on AChE inhibitors and only a modest effect on the degeneration rate is afforded by memantine (Martinez-Coria et al., 2010), there is a vast

interest in newer medications with important neuroprotective qualities.

Though we had previously shown that POEE promnesic effects involve various receptors and its anticholinesterasic properties are robust enough to reverse scopolamine-induced amnesia (Siqueira et al., 2003; da Silva et al., 2008, 2009), this is the first study to provide direct evidence of a protective effect for POEE against A $\beta$ -induced cognitive deficit. It is arguable that POEE attenuation of A $\beta$ -induced neurotoxicity is related to the absence of A $\beta$ -induced cognitive deficit in POEE mice. Even if acutely the anticholinesterase effects of POEE are responsible for reversing the A $\beta$ -induced cognitive deficit, in the long run its neuroprotective effects against A $\beta$ -induced neurotoxicity may be of greater assistance in slowing down the neurodegenerative process that eventually renders anticholinesterase medication ineffective.

To the best of our knowledge, other than huperzine A (Zhang and Tang, 2006), this is the only report of an AChE inhibitor displaying associated neuroprotective properties. Furthermore, considering the relatively short period of treatment our results are particularly promising. Unfortunately, due to the importance of using the very same batch of extract with which promnesic (da Silva et al., 2004, 2007, 2008) and anti-amnesic (da Silva et al., 2004, 2009) effects were shown in mouse models less directly linked to AD, complementary experiments (longer treatment and/or wider dose range) were here precluded.

Given the multifactorial nature of neurodegeneration in itself (Pimplikar, 2009), and the complex interplay of factors relevant to AD susceptibility and course, the benefits of multi-functional drugs have been advocated (Youdim and Buccafusco, 2005). In this context, POEE, here shown to mitigate A $\beta$  consequences in mice, has also been shown to be an effective brain antioxidant (Siqueira et al., 2007), to increase hippocampal cell viability after hypoxia (Siqueira et al., 2004), and to possess relevant AChE inhibitory properties in cognition-important areas (Siqueira et al., 2003; Figueiró et al., 2010).

While there is no absolute correlation between the degree of A $\beta$  deposits and cognitive impairment in rats (Mucke et al., 2000; Koistinaho et al., 2001) and humans (Caughey and Lansbury, 2003), it is undisputable that excessive A $\beta$  deposits are a hallmark of AD (Hardy and Selkoe, 2002). Excessive A $\beta$  plaques resulting from altered cleavage of secretases (Skovronsky and Lee, 2000), changes in A $\beta$  clearance, or both (Selkoe, 2001), suggest that strategies which prevent A $\beta$  accumulation would be instrumental for halting the disease process. The observed reduction in A $\beta$  deposits in the hippocampus of POEE-treated mice is congruent with the reduced astrocytosis seen in the same experimental group. Astrocytosis represents a general response of astrocytes to all types of neuronal injury in the CNS, including A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced neurotoxicity (Van Eldik, 2001). Moreover, astrocyte hypertrophy and increased GFAP expression have been associated with neurodegeneration and aging (Vijayan et al., 1991, Sloane et al., 2000).

There is no clear picture of how A $\beta$  treatment affects BDNF levels. While BDNF mRNA expression in A $\beta$ <sub>1-42</sub>-injected rats was reported to be increased in the hippocampus by Tang et al. (2000), and in glia by Kimura et al. (2006), it was found to be diminished in neuronal cell cultures (Tong et al., 2004; Garzon and Fahnestock, 2007). Direct measures of hippocampal BDNF levels did not reveal significant changes in A $\beta$ <sub>1-42</sub>-treated rats (Christensen et al., 2008). In AD patients, while treatments with cholinesterase inhibitors apparently reverse the observed reductions in serum BDNF (Leyhe et al., 2008), it is in fact unknown whether this effect is associated with treatment response (Lanctôt et al., 2008). In the present study, no significant changes in BDNF were found with either A $\beta$  or POEE treatment.

This study offers evidence of functional and neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* against A $\beta$  peptide-induced neurotoxicity in mice. Complementary experiments are warranted to better characterize this promising effect and its underlying mechanisms, in order

to provide a basis for proper clinical trials.

## 5. Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq for fellowships. This study is associated with/protected by patent US61/297442.

## 6. References

- Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R., 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology*. 68, 209-245.
- Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews: Neuroscience*. 8, 663-72.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., Laferla, F.M., 2005. Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 45, 675-688.
- Caughey, B., Lansbury, P.T., 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annual Review of Neuroscience*. 26, 267-298.
- Christensen, R., Marcussen, A.B., Wortwein, G., Knudsen, G.M., Aznar, S., 2008. A $\beta$ (1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT(2A) levels. *Experimental Neurology*. 210, 164-171.
- Creese, I., Burt, D.R., Snyder, S.H., 1976. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*. 192(4238), 481-483.

da Silva, A.L., Ferreira, J.G., da Silva Martins, B., Oliveira, S., Mai, N., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2008. Serotonin receptors contribute to the promnesic effects of *P. olacoides* (Marapuama). *Physiology & Behavior*. 95(1-2), 88-92.

da Silva, A.L., Piato, A.L., Bardini, S., Netto, C.A., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2004. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 95, 199-203.

da Silva, A.L., Piato, A.L., Ferreira, J.G., Martins, B.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2007. Promnesic effects of *Ptychopetalum olacoides* in aversive and non-aversive learning paradigms. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(3), 449-457.

da Silva, A.L., Silva Martins, B., Linck, V.M., Herrmann, A.P., Mai, N., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2009. MK801- and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a "brain tonic". *Psychopharmacology*. 202(1-3), 165-172.

Dong, H., Martin, M.V., Chambers, S., Csernansky, J.G., 2007. Spatial relationship between synapse loss and beta-amyloid deposition in Tg2576 mice. *The Journal of Comparative Neurology*. 500(2), 311-321.

Emre, M., Geula, C., Ransil, B.J., Mesulam, M.M., 1992. The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. *Neurobiology Aging*. 13, 553-559.

Figueiró, M., Ilha, J., Pochmann, D., Porciúncula, L.O., Xavier, L.L., Achaval, M., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2010. Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal. *Phytomedicine*, *in press*.

Franklin, K.B.J., Paxinos, G.T., 1996. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.

Garzon, D.J., Fahnestock, M., 2007. Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience*. 27, 2628-2635.

Giacobini, E., 2000. Cholinesterase inhibitors do more than inhibit cholinesterase: cholinesterase and cholinesterase inhibitors, in: Giacobini, E. (Ed.). Martin Dunitz: London, pp. 227-235.

Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297, 353-356.

Harkany, T., Hortobagyi, T., Sasvari, M., Konya, C., Penke, B., Luiten, P.G., Nyakas, C., 1999. Neuroprotective approaches in experimental models of beta-amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. 23, 963-1008.

Kim HS, Cho JY, Kim DH, Yan JJ, Lee HK, Suh HW, Song, D.K., 2004. Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of  $\beta$ -amyloid peptide (1-42) in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27(1), 120-121.

Kimura, N., Takahashi, M., Tashiro, T., Terao, K., 2006. Amyloid beta up-regulates brain derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta related neuritic degeneration. *The Journal of Neuroscience Research*. 84, 782-789.



Knobloch, M., Konietzko, U., Krebs, D.C., Nitsch, R.M., 2007. Intracellular Abeta and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcAbeta mice. *Neurobiology Aging*. 28, 1297-1306.

Koistinaho, M., Ort, M., Cimadevilla, J.M., Vondrous, R., Cordell, B., Koistinaho, J., Bures, J., Higgins, L.S., 2001. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid deposits but do not form plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 675-680.

LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews: Neuroscience*. 8, 499-509.

Lanctôt, K.L., Herrmann, N., Rothenburg, L.S., 2008. Commentary: A $\beta$ (1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT<sub>2A</sub> levels. *Experimental Neurology*. 212, 251-254.

Laursen, S.E., Belknap, J.K., 1986. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *Journal of Pharmacological Methods*. 16, 355-357.

Leyhe, T., Stransky, E., Eschweiler, G.W., Buchkremer, G., Laske, C., 2008. Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 258, 124-128.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.

Martinez-Coria, H., Green, K.N., Billings, L.M., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., Parsons, C.G., Gupta, S., Banerjee, P., LaFerla, F.M., 2010. Memantine improves cognition

and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *The American Journal of Pathology*. 176(2), 870-880.

Masliah, E., Crews, L., Hansen, L., 2006. Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 9(3), 91-99.

Maurice, T., Hiramatsu, M., Itoh, J., Kameyama, T., Hasegawa, T., Nabeshima, T., 1994. Behaviour evidence for modulation role of  $\sigma$  ligands in memory process. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)- induced amnesia. *Brain Research*. 647, 44-56.

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., McConlogue, L., 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of Neuroscience*. 20, 4050-4058.

Netto, C.A., Izquierdo, I., 1985. On how passive is inhibitory avoidance. *Behavioral and Neural Biology*. 43, 327-330.

Nitta, A., Tuktta, T., Hasegawa, T., Nabeshima, T., 1997. Continuous infusion of  $\beta$ -amyloid protein into the rat cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration. *Japanese Journal of Pharmacology*. 73, 51-57.

Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., Vassar, R., 2006. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience*. 26, 10129-10140.

Pimplikar, S.W., 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease.

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 41,1261-1268.

Prediger, R.D.S., 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. Behavioral Brain Research. 2177, 205-213.

Probst, A., Langui, D., Ulrich, J., 1991. Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. Brain Pathology. 1, 229-239.

Radde, R., Duma, C., Goedert, M., Jucker, M., 2008. The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 35, S70-74.

Rauk, A., 2009. The chemistry of Alzheimer's disease. Chemical Society Reviews. 38, 2698-2715.

Selkoe, D.J., 2001. Clearing the brain's amyloid cobwebs. Neuron. 32, 177-180.

Siqueira, I.R., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Nunes, D.S., Salbego, C., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2004. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. Life Science. 75(15), 1897-1906.

Siqueira, I.R., Fochesatto, C., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Battastini, A.M., Netto, C.A., Elisabetsky, E., 2003. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. Pharmacology, Biochemistry, and Behavior. 75(3), 645-50.

Siqueira, I.R., Fochesatto, C., Torres, I.L.S., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2007. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* (“muirapuama”) in mice brain. *Phytomedicine*. 14(11), 763-769.

Skovronsky, D.M., Lee, V.M-Y., 2000.  $\beta$ -Secretase revealed: starting gate for race to novel therapies for Alzheimer’s disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21(5), 161-163.

Sloane, J.A., Hollander, W., Rosene, D.L., Moss, M.B., Kemper, T., Abraham, C.R., 2000. Astrocytic hypertrophy and altered GFAP degradation with age in subcortical white matter of the rhesus monkey. *Brain Research*. 862, 1-10.

Tang, Y., Yamada, K., Kanou, Y., Miyazaki, T., Xiong, X., Kambe, F., Murata, Y., Seo, H., Nabeshima, T., 2000. Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid in rats. *Brain Research: Molecular Brain Research*. 80, 188-197.

Tong, L., Balazs, R., Thornton, P.L., Cotman, C.W., 2004. Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *Journal of Neuroscience*. 24, 6799-6809.

Van Eldik, L.J., 2001. Glia and Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 396, 329-331.

Vijayan, V.K., Geddes, J.W., Anderson, K.J., Chang-Chui, H., Ellis, W.G., Cotman, C.W., 1991. Astrocyte hypertrophy in the Alzheimer’s disease hippocampal formation. *Experimental Neurology*. 112, 72-78.

Wang, R., Zhang, H.Y., Tang, X.C., 2001. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by  $\beta$ -amyloid protein (1-40) in rats. *European Journal of*

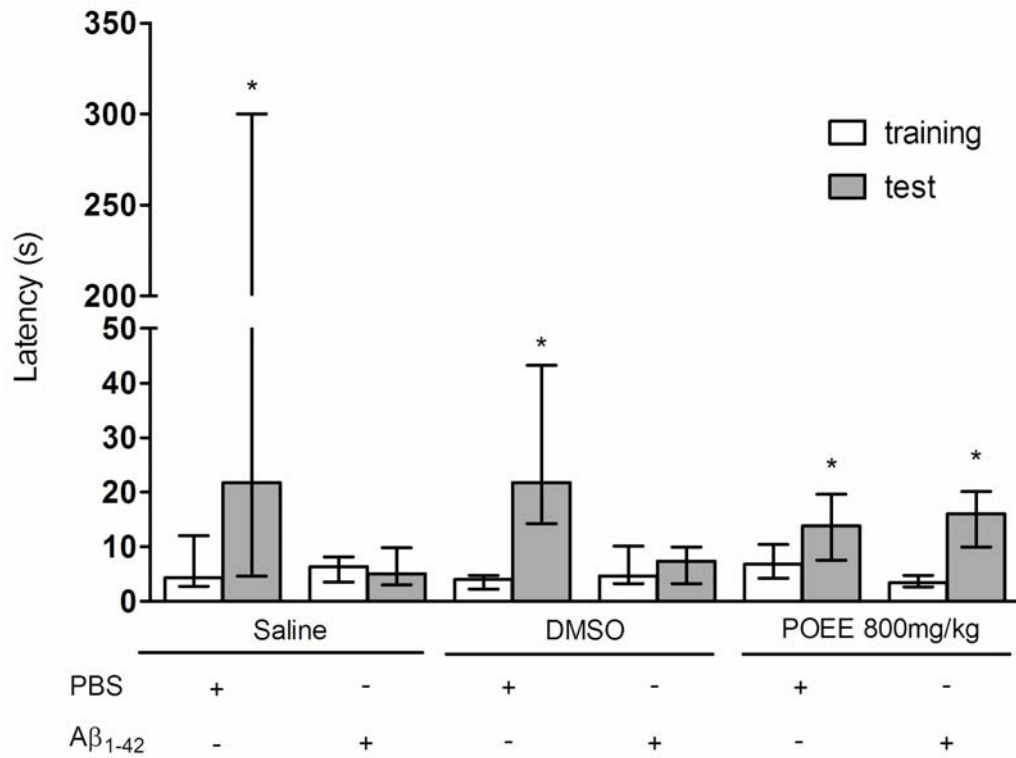
Pharmacology. 421, 149-156.

Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Research: Brain Research Protocols*. 16, 58-64.

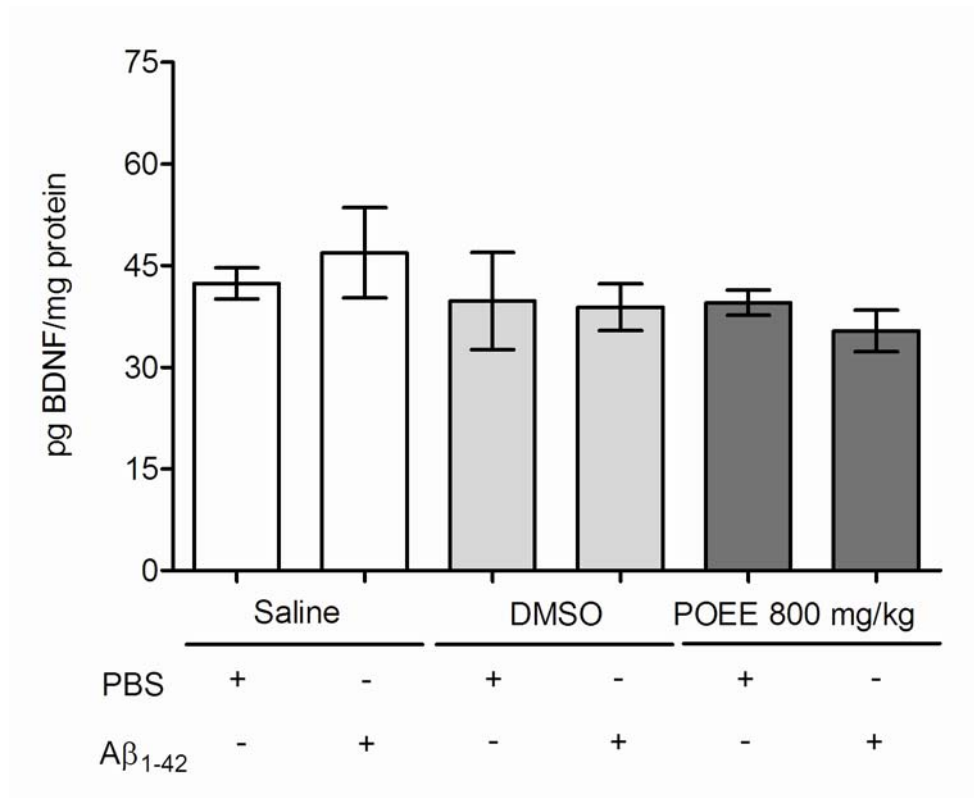
Yan, J.J., Cho, J.Y., Kim, H.S., Kim, K.L., Jung, J.S., Huh, S.O., Suh, H.W., Kim, Y.H., Song, D.K., 2001. Protection against beta -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 133, 89-97.

Youdim, M.B.H., Buccafusco, J.J., 2005. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*. 26, 27-35.

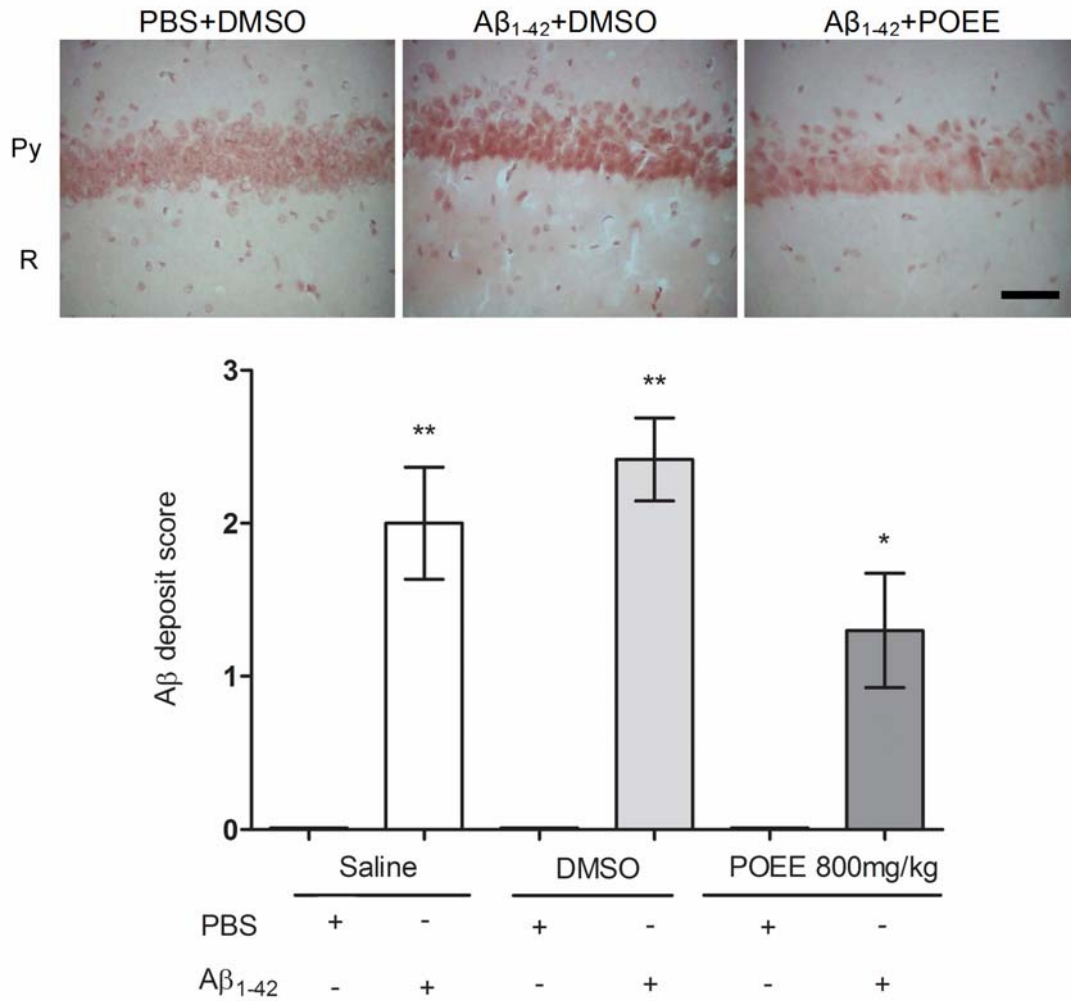
Zhang, H.Y., Tang, X.C., 2006. Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27, 619-625.



**Figure 1.** Effects of POEE on A $\beta_{1-42}$ -induced long term memory impairment in the step-down inhibitory avoidance test in mice. Each column represents median (interquartile ranges) of training (light columns) or test (gray columns) latencies in seconds (24 h training-test interval). A $\beta_{1-42}$  administered i.c.v.; POEE (800 mg/kg) administered p.o. for 14 days. n=12. \*  $P < 0.05$  test  $\times$  training for each treatment, Wilcoxon.

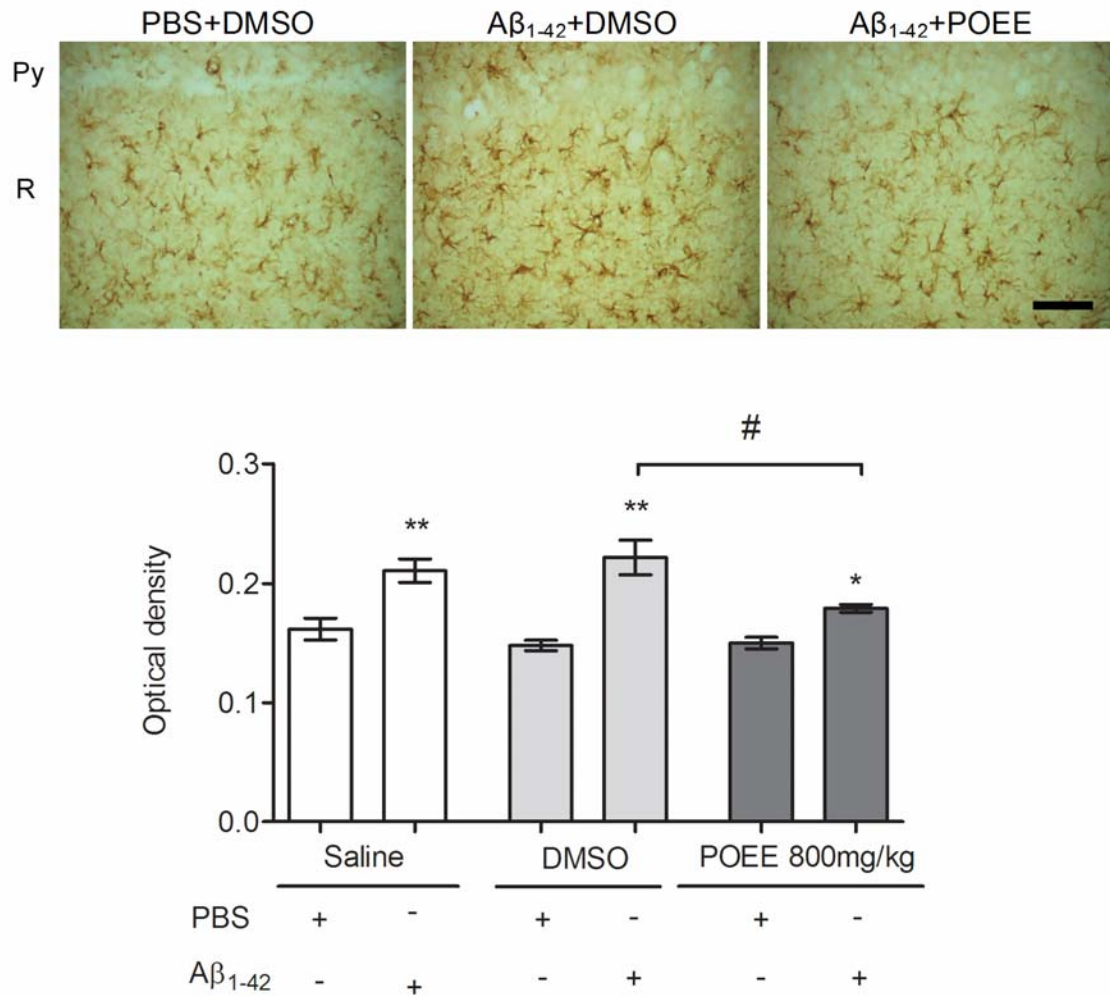


**Figure 2.** Effects of POEE on BDNF levels in hippocampus of Aβ<sub>1-42</sub>-treated mice. Aβ<sub>1-42</sub> administered i.c.v.; POEE (800 mg/kg) administered p.o. for 14 days. n=6. Results expressed as mean ± S.E.M., ANOVA/Duncan.

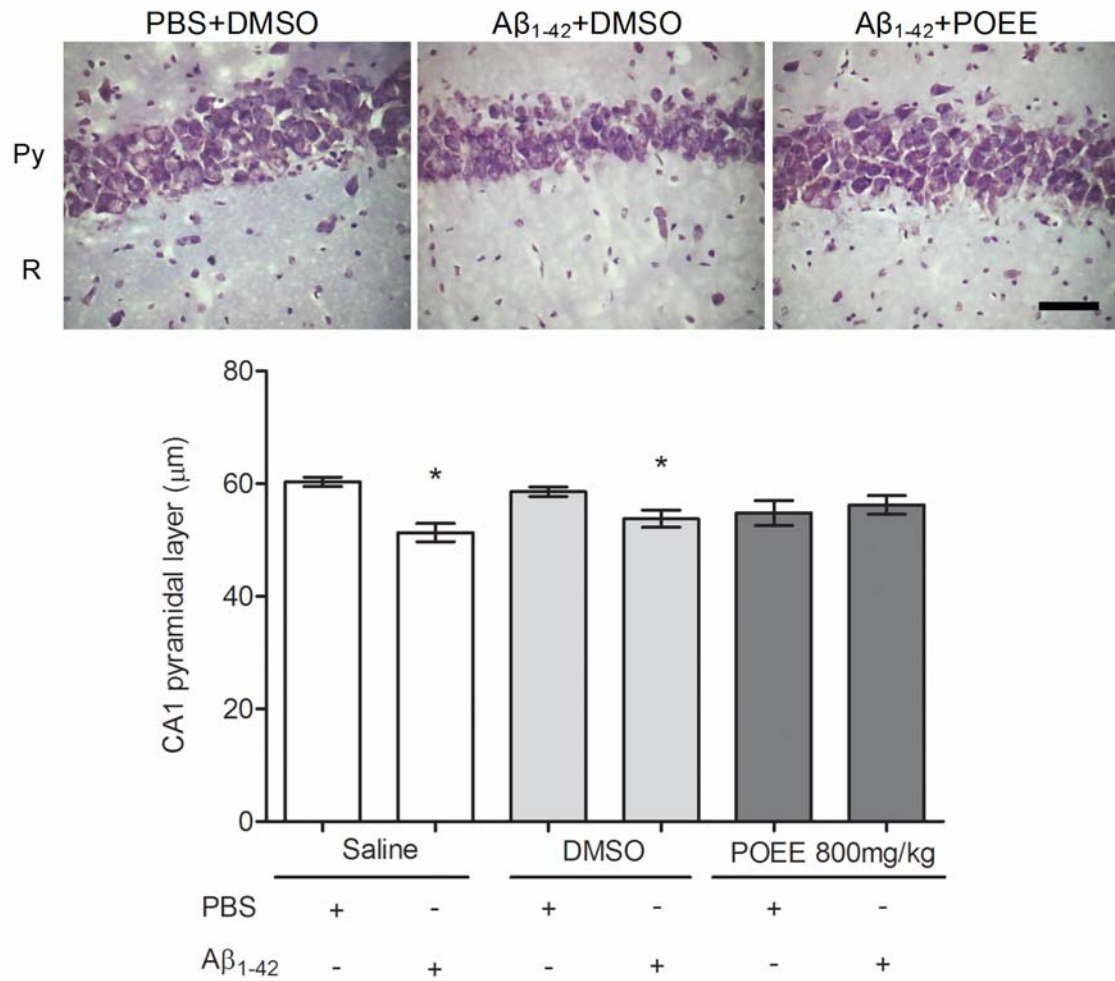


**Figure 3.** Effects of POEE on Aβ<sub>1-42</sub>-amyloid deposits in mouse hippocampus. Panels show representative images of CA1 from PBS-, Aβ<sub>1-42</sub>-, and POEE-treated mice (scale bar = 50 μm, 20 x magnification). Histogram data are presented as means ± S.E.M. Aβ<sub>1-42</sub> administered i.c.v.; POEE (800 mg/kg) administered p.o. for 14 days. n=6 \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  vs. PBS controls; Mann-Whitney.





**Figure 4.** Effects of POEE on GFAP expression in hippocampus from Aβ<sub>1-42</sub>-treated mice. Panels show representative images of CA1 from PBS-DMSO-, Aβ<sub>1-42</sub>-DMSO-, and Aβ<sub>1-42</sub>-POEE-treated mice (scale bar = 50 μm, 20 x magnification). Histogram data are presented as means ± S.E.M. (N= 6); optical density (OD) is expressed in pixels. Aβ<sub>1-42</sub> administered i.c.v.; POEE (800 mg/kg) administered p.o. for 14 days. n=6 \*  $P < 0.05$ , and \*\*  $P < 0.01$  vs. PBS controls; #  $P < 0.05$ , ANOVA/Duncan.



**Figure 5.** Effects of POEE on neuronal loss in CA1 hippocampus (pyramidal layer) from Aβ<sub>1-42</sub>-treated mice. Panels show representative images of CA1 from PBS-, Aβ<sub>1-42</sub>-, and POEE-treated mice (scale bar = 50 μm, 20 x magnification). Histogram data are presented as mean ± S.E.M Aβ<sub>1-42</sub> administered i.c.v.; POEE (800 mg/kg) administered p.o. for 14 days. n=6 \* *P* < 0.05 vs. controls, ANOVA/Duncan.

#### 4. DISCUSSÃO

As demências recebem esse nome porque comprometem de forma significativa a memória e também outras funções cognitivas, com intensidade suficiente para produzir perda funcional, incluindo, eventualmente, a realização de atividades da vida diária ou o reconhecimento de pessoas e lugares do entorno habitual (SQUIRE & KANDEL, 2000). A demência pode ser decorrente de muitas patologias, sendo uma das formas mais comuns a DA (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2009).

Como descrito anteriormente, as propriedades terapêuticas alegadas pelos usuários para remédios populares à base de Marapuama, incluem a melhora do desempenho intelectual e físico em pacientes que passam por períodos prolongados de estresse (físico ou psicológico) ou devido a problemas de saúde como “derrames”. No contexto de psicofarmacologia, cabe ainda dizer que idosos relatam que se sentem mais atentos e inseridos ao ambiente. Nosso grupo já demonstrou que o perfil psicofarmacológico de um extrato etanólico de Marapuama (EEPO) inclui atividade antioxidante (SIQUEIRA *et al.*, 2002; 2007), neuroprotetora (SIQUEIRA *et al.*, 2004), ação anticolinesterásica (SIQUEIRA *et al.*, 2003) e promnésica em camundongos adultos (da SILVA *et al.*, 2004; 2007; 2008) e reversão de amnésia induzida por escopolamina e MK-801 ou idade (animais de 14 meses) (da SILVA *et al.*, 2004; 2009).

Considerando a relação entre os usos tradicionais e populares de Marapuama e os resultados em modelos animais, o objetivo geral desse estudo foi complementar a caracterização da inibição da AChE e verificar a relevância da neuroproteção conferida por esta inibição num modelo animal de DA.

Quanto ao primeiro objetivo, os resultados indicaram que o extrato inibe marcadamente as isoformas G1 e G4 da AChE em áreas cerebrais relevantes para os processos cognitivos, tais como córtex frontal, hipocampo e estriado. Observamos que em córtex frontal a curva concentração-efeito parece ser em forma de U invertido, enquanto que em hipocampo e

estriado uma curva em U é aparente. No entanto, não houve clara relação concentração-efeito, um aspecto de maior importância para a caracterização do efeito de uma droga. O que pode contribuir para a falta de clareza na relação concentração-efeito, é o fato de o EEPO ser uma mistura complexa de compostos ativos e não-ativos, incluindo vários compostos estruturalmente relacionados com propriedades anticolinesterásicas. Apesar disso, este resultado foi surpreendente, já que se a quantidade de compostos ativos permanece estável no extrato, o efeito inibitório deveria aumentar com o aumento da concentração do EEPO. Além disso, apesar de se tratar do mesmo extrato, nossos resultados diferem dos demonstrados por SIQUEIRA e col. (2003) que mostram (*in vitro*) uma inibição concentração e tempo dependente. Essa diferença pode ser devido à fonte enzimática utilizada, já que SIQUEIRA e col. (2003) demonstraram tais efeitos para AChE total (contendo uma mistura de todas as isoformas do SNC) e não nas isoformas da AChE separadamente.

De qualquer maneira, embora a análise definitiva do perfil anticolinesterásico requeira a disponibilidade dos compostos isolados e suas variadas combinações, neste estudo EEPO demonstrou um padrão claramente seletivo de inibição quanto as diferentes isoformas da AChE: G1 é preferencialmente inibida pelo EEPO em hipocampo, enquanto G4 é altamente inibida em córtex frontal e estriado. Tem sido sugerido que uma maior proporção da isoforma G1 é encontrada em pacientes com DA (devido à diminuição diferencial na expressão da G4) sugerindo assim que um inibidor ideal da AChE para o tratamento da DA iniba preferencialmente a isoforma G1 (SIEK *et al.*, 1990; SCHEGG *et al.*, 1992). Embora a relevância clínica de tais diferenças nos perfis inibitórios da AChE (especificidade quanto a isoformas) ainda não tenha sido claramente estabelecida, a intensidade da inibição de isoformas da enzima em região específicas são fatores que influenciam a eficácia assim como os perfis de tolerabilidade de anticolinesterásicos. Por exemplo, o alcalóide Huperzina A tal como o donepezil são inibidores seletivos de G4 em várias regiões do encéfalo, (WANG *et*

*al.*, 2001; ZHAO & TANG, 2002), enquanto que a rivastigmina é inibidor seletivo de G1 (RAKONCZAY, 2003; LANE *et al.*, 2004; 2006).

A análise cinética realizada neste estudo indicou que, pelo menos em hipocampo, a inibição da AChE induzida por EEPO também é diferente para as duas isoformas da enzima. EEPO age como um inibidor competitivo da isoforma G1, enquanto que com relação à G4 a inibição é do tipo incompetitiva. A natureza da inibição pode ser determinada pelo microambiente em torno do sítio ativo, que ao mesmo tempo é um fator que contribui para determinar a seletividade tanto para os substratos quanto para as isoformas da AChE (ZHAO & TANG, 2002). A compreensão detalhada da interação de G1 e G4 com EEPO obviamente requer a elucidação estrutural do(s) composto(s) ativo(s).

Embora se tenha feito a relação entre as atividades promnésicas e antiamnésicas de EEPO e a sua atividade anticolinesterásica, até este trabalho não havia dados conclusivos sobre a inibição da AChE induzida pelo EEPO administrado oralmente em áreas cerebrais relevantes para a cognição. Considerando ser o acesso ao SNC um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento de novas drogas psicoativas, o próximo passo foi verificar através de análises histoquímicas e bioquímicas os efeitos do EEPO administrado oralmente na mesma dose que demonstrou melhorar vários tipos de memória (da SILVA *et al.*, 2004; 2007; 2008) e reverter vários tipos de amnésia (da SILVA *et al.*, 2009) em camundongos. A principal contribuição deste estudo é a prova conclusiva de que o(s) composto(s) anticolinesterásico(s) presente(s) em uma dose efetiva de EEPO quanto a memória é (são) oralmente eficaz(es) e atravessam a barreira hematoencefálica, levando à significativa inibição da AChE em áreas cerebrais relevantes para a cognição. Complementando o estudo onde EEPO foi administrado intraperitonealmente em ratos idosos (14 meses) (SIQUEIRA *et al.*, 2003), este estudo demonstrou histoquimicamente que a atividade da AChE é inibida (cerca de 33% em CA1 do hipocampo, 20% em CA3 do hipocampo, e 17% em estriado) em animais tratados com a dose

oral que demonstra facilitar a memória mas não em doses que não afetam a memória.

Bioquimicamente, os dados *ex vivo* estão de acordo com nossos resultados *in vitro*, pois as atividades das isoformas G1 e G4 da AChE foram significativamente inibidas. Os níveis de inibição observados são comparáveis ou maiores do que os relatados para donepezil e rivastigmina (30-46%), utilizando o mesmo método analítico (KOSASA *et al.*, 1999). No entanto, é preciso ter em mente que doses/concentrações ativas do extrato serão drasticamente reduzidas com a purificação do(s) composto(s) ativo(s) ou mesmo um extrato mais limpo e enriquecido de seus compostos ativos. A análise de Western blotting não demonstrou mudanças no imunoconteúdo da AChE nas áreas estudadas, sugerindo que EEPO não tem efeito sobre a quantidade de enzima presente nesses tecidos mas sim sobre sua função.

Embora os déficits na neurotransmissão colinérgica sejam apenas um dos vários fatores que contribuem para a disfunção cognitiva observada na DA (BIERER *et al.*, 1995; PERRY *et al.*, 2001), um declínio na função colinérgica nos pacientes com DA tem sido demonstrado em áreas específicas do cérebro relevantes para a cognição (CANDY *et al.*, 1983; COYLE *et al.*, 1983; WHITEHOUSE *et al.*, 1981). A inibição *ex vivo* demonstrada neste estudo, é consistente com a ação inibitória seletiva da isoforma G1 em hipocampo e G4 em estriado e córtex frontal observadas nos estudos *in vitro*. Curiosamente, a AChE não foi inibida em áreas cerebrais ricas em ACh, como o núcleo anterior basolateral da amígdala e o córtex entorrinal lateral. Pode-se sugerir que as diferenças na abundância de lipídeos em diferentes áreas do encéfalo podem influenciar a distribuição regional dos compostos lipofílicos (PARDRIDGE, 2003; 2007), ou que o aumento do *turnover* da AChE nas áreas do encéfalo altamente ativas durante o aprendizado e as diversas fases da memória possam influenciar o acesso dos compostos inibidores da AChE ao estado susceptível da enzima (MICHALEK *et al.*, 1990).

Ainda que não claramente definida em termos clínicos, há pesquisadores que

defendem o considerável corpo de evidências indicando a utilidade do desenvolvimento de compostos anticolinesterásicos com atividade específica para regiões e isoformas como estratégia para melhorar a eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis para déficits cognitivos em geral, DA, em particular (ZHAO & TANG, 2002; WANG *et al.*, 2006). Além disso, ao invés de usar compostos com um único mecanismo de ação para o tratamento de doenças complexas como a DA, o uso de compostos multi ou bifuncionais tem sido defendido na tentativa de alcançar uma maior eficácia na neuroproteção (ANEKONDA & REDDY, 2005; YOU DIM & BUCCAFUSCO, 2005; BOLOGNESI *et al.*, 2007). Neste contexto, o alcalóide Huperzine A não apenas possui ação anticolinesterásica como também modula vias pró- e antiapoptóticas, além de apresentar um perfil neuroprotetor mais amplo e complexo (WANG *et al.*, 2001). Vários efeitos do EEPO sugerem o seu potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas associadas com déficit colinérgico, incluindo: a capacidade de reverter amnésias (causada pelo envelhecimento, escopolamina ou MK-801) (da SILVA *et al.*, 2004; 2009), sua propriedade anticolinesterásica seletiva (seletividade para colinesterases centrais, para isoformas específicas e aparente seletividade regional para as áreas cerebrais relevantes para a cognição), bem como marcada propriedade antioxidante (SIQUEIRA *et al.*, 2007) e neuroprotetora (SIQUEIRA *et al.*, 2004).

Considerando que as vias colinérgicas são cruciais para a cognição e muito sensíveis à toxicidade do peptídeo beta-amilóide (EMRE *et al.*, 1992), que o uso de IACHÉ é o principal tratamento para as fases inicial e moderada da DA, o último objetivo desse estudo foi verificar se o tratamento com EEPO (14 dias) seria capaz de neutralizar ou atenuar os efeitos da infusão intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> em camundongos. A toxicidade induzida pelo A $\beta$  que resulta em déficit de neurotransmissores e disfunção sináptica pode envolver dano oxidativo, neuroinflamação, ativação de diferentes quinases, e aumento da apoptose (MASLIAH *et al.*, 2006).

Verificamos que após 14 dias de tratamento com EEPO iniciado logo após a infusão do peptídeo, o comprometimento da memória induzido pelo  $A\beta_{1-42}$  foi efetivamente prevenido, assim como a perda neuronal em CA1 (mensurada pela espessura da camada piramidal), além de redução dos depósitos  $A\beta$  e da conseqüente astrocitose. Mesmo que nenhum dos modelos animais hoje disponíveis reproduza a matriz patológica completa da DA (RADDE *et al.*, 2008), os prejuízos de memória e os aspectos neurodegenerativos associados a DA foram reproduzidos em diversos modelos transgênicos e com infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-42}$  em camundongos assim como neste estudo (NITTA *et al.*, 1997; BILLINGS *et al.*, 2005; OAKLEY *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2007). Considerando o caráter progressivo da DA, há um grande interesse em novos medicamentos com importantes propriedades neuroprotetoras, já que o principal tratamento sintomático para DA ainda depende dos IChEs e apenas um efeito modesto sobre a degeneração é conferido pelo antagonista glutamatérgico memantina (MARTINEZ-CORIA *et al.*, 2010) usado em formas mais graves da doença onde os IChEs são destituídos de efeito se administrados sozinhos.

Embora se saiba que os efeitos promnésicos do EEPO envolvam vários receptores e sua propriedade anticolinesterásica seja robusta o suficiente para reverter a amnésia induzida por escopolamina (da SILVA *et al.*, 2008; 2009), este estudo é o primeiro a fornecer evidências diretas sobre efeito protetor do EEPO contra a amnésia bem como sinais de neurodegeneração induzidas pelo  $A\beta$ . Esse resultado é altamente significativo, já que mesmo que os efeitos anticolinesterásicos observados agudamente com EEPO sejam responsáveis por reverter a amnésia induzida pelo  $A\beta$ , a longo prazo, os efeitos neuroprotetores do EEPO contra a neurotoxicidade do peptídeo  $A\beta$  pode ser essencial para desacelerar o processo neurodegenerativo, o que eventualmente torna os anticolinesterásicos uma medicação ineficaz.

Nesse contexto, além da huperzina A (ZHANG & TANG, 2006), o EEPO é um dos



poucos IChE documentados que exibe propriedades neuroprotetoras. Os resultados são particularmente promissores apesar do período relativamente curto de tratamento usado neste trabalho. Infelizmente, devido à relevância de se usar exatamente o mesmo lote do extrato com o qual se documentou os efeitos promnésico e antiamnésico, experimentos complementares (tratamento mais longo e/ou faixa de doses) não foram passíveis de serem realizados.

Embora não exista uma correlação absoluta entre os depósitos de A $\beta$  e o grau de disfunção cognitiva em camundongos (MUCKE *et al.*, 2000; KOISTINAHO *et al.*, 2001) e humanos (CAUGHEY & LANSBURY, 2003), é inquestionável que o excesso de depósitos A $\beta$  é um marcador histopatológico da DA (HARDY & SELKOE, 2002). Considerando o excesso de placas amilóide resultante da clivagem alterada das secretases (SKOVRONSKY & LEE, 2000), as alterações na depuração do A $\beta$ , ou ambos (SELKOE, 2001), estratégias que impeçam o acúmulo excessivo do peptídeo serão decisivas para deter o processo da doença. A redução dos depósitos A $\beta$  observada no hipocampo dos animais tratados com EEPO condiz com a redução da astrocitose observada no mesmo grupo experimental. Astrocitose representa uma resposta dos astrócitos a todos os tipos de lesões neuronais no SNC, incluindo a neurotoxicidade induzida pela infusão do A $\beta_{1-42}$  (VAN ELDIK, 2000). Ainda que considerando as limitações do método utilizado na avaliação, que não incluiu um marcador específico de morte neuronal (*e.g.* FluoroJade), podemos inferir que houve algum processo deletério que reduziu a quantidade de células nervosas na camada piramidal de CA1, do qual os animais tratados com o extrato foram significativamente protegidos. Novamente, considerando o tempo reduzido de tratamento e as implicações a longo prazo da redução de células em CA1, este é um dado neuroprotetor importante que merece ser melhor caracterizado no futuro.

Nesse estudo, os níveis de BDNF não foram alterados, demonstrando que a melhora

da memória obtida pelo tratamento com EEPO não está relacionada com o aumento nos níveis deste fator neurotrófico. Não é claro se o tratamento com A $\beta$  afeta os níveis de BDNF. Enquanto a expressão de BDNF em ratos que receberam A $\beta_{1-42}$  demonstrou estar aumentada em hipocampo (TANG *et al.*, 2000) e glia (KIMURA *et al.*, 2006), parece estar diminuída em culturas de células neuronais (TONG *et al.*, 2004; GARZON & FAHNESTOCK, 2006). Além disso, medidas diretas dos níveis de BDNF no hipocampo de ratos tratados com A $\beta_{1-42}$  não revelou alterações significativas (CHRISTENSEN *et al.*, 2008). Em pacientes com DA, apesar do tratamento com IChEs aparentemente reverter as reduções de BDNF no soro (LEYHE *et al.*, 2008), não se sabe se este efeito está associado com a resposta ao tratamento (LANCTÔT *et al.*, 2008).

Dada a natureza multifatorial da neurodegeneração e da complexa interação de fatores relevantes para uma maior susceptibilidade à DA, os benefícios de drogas com ação multifuncional tem sido defendidos (ANEKONDA & REDDY, 2005; YAUDIM & BUCCAFUSCO, 2005; BOLOGNESI *et al.*, 2007). Neste contexto, nosso trabalho demonstrou que EEPO atua como neuroprotetor contra insulto induzido pelo A $\beta$ , o que se soma as suas já demonstradas capacidades de eficaz antioxidante (SIQUEIRA *et al.*, 2007), de aumentar a viabilidade neuronal em hipocampo submetido à hipóxia (SIQUEIRA *et al.*, 2004), complementando de forma desejável a relevante propriedade anticolinesterásica em áreas importantes para a cognição (SIQUEIRA *et al.*, 2003; FIGUEIRÓ *et al.*, *in press*).

Em resumo, este estudo resultou em uma melhor caracterização das propriedades anticolinesterásicas do extrato de *Ptychopetalum olacoides*, além de demonstrar sua eficácia num modelo animal validado da doença de Alzheimer, dando nova dimensão as propriedades nootrópicas anteriormente identificadas. Tanto a caracterização dos efeitos anticolinesterásico e neuroprotetores desta espécie, quanto o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos, depende da elucidação do(s) princípio(s) ativo(s). Ao mesmo tempo, como em outros casos de

plantas medicinais incluindo o *Ginkgo biloba*, é provável que um extrato complexo ou uma mistura de princípios ativos seja mais efetivo que um composto isolado, especialmente considerando a natureza multifatorial da patologia em questão. Não se pode subestimar o valor da coerência destes achados experimentais com as propriedades terapêuticas alegadas por usuários de preparações caseiras feitas com esta espécie medicinal. Os resultados foram suficientemente robustos para que fossem depositados em forma de patente (US61297442), que trata do uso do extrato e seus componentes como inibidor da acetilcolinesterase em composições farmacêuticas, no contexto do desenvolvimento de novos medicamentos úteis como neuroprotetores para o tratamento de déficits cognitivos de diversas etiologias, e para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

## 5. CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou que o extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) administrado por via oral possui robusta atividade anticolinesterásica em áreas relevantes para a cognição e que o tratamento por duas semanas é capaz de prevenir (ou ao menos minimizar significativamente) tanto os déficits de memória quanto as alterações neuropatológicas induzidas pela infusão do peptídeo beta amiloide (um modelo animal consolidado de DA).

Especificamente demonstramos que:

- ➔ EEPO apresentou robusta propriedade anticolinesterásica seletiva para colinesterases centrais e para isoformas específicas, com aparente seletividade regional para as áreas cerebrais relevantes para a cognição;
- ➔ EEPO age como um inibidor competitivo da isoforma G1 e incompetitivo da isoforma G4;
- ➔ EEPO é biodisponível oralmente e atravessa a barreira hematoencefálica, levando à significativa inibição da AChE em áreas cerebrais relevantes para a cognição;
- ➔ EEPO previne o comprometimento da memória induzido por  $A\beta_{1-42}$ , assim como a perda neuronal em CA1, além de reduzir os depósitos  $A\beta$  e a astrocitose.

Este estudo se contextualiza na busca por novas drogas para o tratamento de déficits cognitivos e demências, tais como a DA, e oferece evidências dos efeitos funcionais dessa espécie medicinal. Há um permanente interesse pelo uso das plantas medicinais e/ou seus respectivos extratos em terapêutica, que se constituem em certas circunstâncias numa imprescindível ferramenta nos cuidados primários de saúde e, em outras, num excelente complemento terapêutico compatível com a medicina contemporânea. No entanto é consenso

que o uso terapêutico de plantas medicinais deva seguir critérios claros de segurança e eficácia, que implicam além do controle de qualidade num conhecimento adequado sobre efeitos adversos e tóxicos, possíveis interações medicamentosas e contra-indicações. Além disso, se fazem necessários os ensaios farmacológicos e a experimentação clínica que demonstrem eficácia para este tipo de medicamento. Espera-se com este trabalho ter contribuído para aumentar o interesse dos que possam implementar os passos necessários para o eventual desenvolvimento de fármacos a partir de *Ptychopetalum olcaoides*, que como indicam os dados deste trabalho podem ser inclusive úteis para o manejo de demências incluindo a de Alzheimer.

## 6. REFERÊNCIAS:

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 2007. Disponível em: [www.alz.org](http://www.alz.org)

ALDUNATE, R.; CASAR, J.C.; BRANDAN, E. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Res. Rev.**, 47:96-104, 2004.

ANEKONDA, T.S.; REDDY, P.H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Res. Rev.**, 50, 361-376, 2005.

ATAK, J.R.; PERRY, E.K.; BONHAM, J.R.; PERRY, R.H. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development: a study of molecular forms. **Neurochem Int.**, 21:381-396, 1986.

BALICK, M.J.; COX, P.A. IN: Plants, People, and Culture: The Science of Ethnobotany. New York: Scientific American Library, 1996.

BIERER, L.M.; HAROUTUNIAN, V.; GABRIEL, S.; KNOTT, P.J.; CARLIN, L.S.; PUROHIT, D.P.; PERL, D.P.; SCHMEIDLER, J.; KANOF, P.; DAVIS, K.L. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. **J. Neurochem.**, 64(2):749-60, 1995.

BILLINGS, L.M.; ODDO, S.; GREEN, K.N.; MCGAUGH, J.L.; LAFERLA, F.M. Intra-neuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. **Neuron**, 45:675-688, 2005.

BIRKS, J. Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **Cochrane DataBase Syst.**, (1):CD005593, 2006.

BIRKS, J.; GRIMLEY, E.V.; VAN DONGEN, M. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia (Cochrane Review). IN: Cochrane Library. **Cochrane Database Syst. Rev.** 4: CD003120, 2002.

BLENNOW, K.; DE LEON, M.J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**, 368(9533):387-403, 2006.

BRAAK, E.; GRIFFING, K.; ARAI, K.; BOHL, J.; BRATZKE, H.; BRAAK, H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, 249 (3):14-22, 1999.

BOLOGNESI, M.L.; MINARINI, A.; TUMIATTI, V.; MELCHIORRE, C. Progress in acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Expert Op. Ther. Patents.**, 16(6):811-823, 2007.

CABRAL, S.; AGRA, M.F. **Olacaceae medicinais do Brasil, Parte I: *Ximenia americana* L & *Phycopetalum olacoides* Benth.** Anais do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Florianópolis, Santa Catarina, pp.55, 1996.

CANDY, J.M.; PERRY, R.H.; PERRY, E.K.; IRVING, D.; BLESSED, G.; FAIRBAIRN, A.F.; TOMLINSON, B.E. Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, 59:277-289, 1983.

CARLSON, T.J.; COOPER, R.; KING, S.R.; ROZHON, E.J. Modern science and traditional healing. **R. Soc. Med. Sp. Pub. Phytochem. Div.**, 200:84-95, 1997a.

CARTER, J.; LIPPA, C.F. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. **Curr. Mol. Med.**, 1(6):733-737, 2001.

CASSERLY, I.; TOPOL, E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. **Lancet**, 363(9415):1139-1146, 2004.

CAUGHEY, B.; LANSBURY, P.T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. **Annu. Rev. Neurosci.**, 26:267-298, 2003.

CERQUEIRA, A.T.A.R.; OLIVEIRA, N.I.L. Programa de Apoio a cuidadores: uma ação terapêutica e preventiva na atenção à saúde dos idosos. **Psicologia USP**, 13(1):133-150, 2002.

CHACÓN, M.A.; REYES, A.E.; INESTROSA, N.C. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. **J. Neurochem.**, 15:87:91, 2003.

CHAIMOWICZ, F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Rev. Saúde Pública**, 31:184-200, 1998.

CHAIMOWICZ, F. Os Idosos Brasileiros no Século XXI: Demografia, Saúde e Sociedade. Belo Horizonte, Postgraduate, 1998.

CHRISTENSEN, R.; MARCUSSEN, A.B.; WORTWEIN, G.; KNUDSEN, G.M.; AZNAR, S. Aβ(1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT(2A) levels. **Exp. Neurol.**, 210:164-171, 2008.

CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. **Arch. Neurol.**, 55:1449-1455, 1998.



COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish J. Biochem.**, 28:54-61, 2003.

COYLE, J.T.; PRICE, D.L.; DELONG, M.R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science**, 219(4589):1184-1190, 1983.

CUMMINGS, J.L.; COLE, G. Alzheimer Disease. **JAMA**, 287(18):2335-2338, 2002.

DA SILVA, A.L.; PIATO, A.L.; BARDINI, S.; NETTO, C.A.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. **J. Ethnopharmacol.**, 95:199-203, 2004.

DA SILVA, A.L.; PIATO, A.L.; FERREIRA, J.G.; MARTINS, B.S.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Promnesic effects of *Ptychopetalum olacoides* in aversive and non-aversive learning paradigms. **J. Ethnopharmacol.**, 109(3):449-457, 2007.

DA SILVA, A.L.; FERREIRA, J.G.; DA SILVA MARTINS, B.; OLIVEIRA, S.; MAI, N.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Serotonin receptors contribute to the promnesic effects of *P. olacoides* (Marapuama). **Physiol. Behav.**, 95(1-2):88-92, 2008.

DA SILVA, A.L.; SILVA MARTINS, B.; LINCK, V.M.; HERRMANN, A.P.; MAI, N.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. MK801- and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a "brain tonic". **Psychopharmacology**, 202(1-3):165-172, 2009.

DANYSZ, W.; PARSONS, C.G.; MÖBIUS, H-J.; STOFFLER, A.; QUACK, G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease a unified hypothesis on the mechanism of action. **Neurotoxicity Res.**, 2: 85-98, 2000.

DAY, T.; GREENFIELD, S.A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms. **Neuroscience**, 111:649-656, 2002.

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

DESCARIES, L.; GISIGER, V.; STERIADE, M. Diffuse transmission by acetylcholine in CNS. **Prog. Neurobiol.**, 53:6025-6030, 1997.

DICKSON, T.C.; VICKERS, J.C. The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 105(1):99-107, 2001.

DINIZ, B.S.; PINTO, J.A.Jr.; GONZAGA, M.L.; GUIMARÃES, F.M.; GATTAZ, W.F.; FORLENZA, O.V. To treat or not to treat? A meta-analysis of the use of cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment for delaying progression to Alzheimer's disease. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, 259(4):248-256, 2009.

DONG, H.; MARTIN, M.V.; CHAMBERS, S.; CSERNANSKY, J.G. Spatial relationship between synapse loss and beta-amyloid deposition in Tg2576 mice. **J. Comp. Neurol.**, 500(2):311-321, 2007.

ELISABETSKY, E.; STZER, R. Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia. IN: **The Amazonian Caboclo: Historical and Contemporary Perspectives**. Parker, E.P. (ed), Studies on third World Societies Publication Series, Williamsburg, 32, pp.243-278, 1985.

ELISABETSKY, E. From indigenous disease concepts to laboratory work hypothesis: the Brazilian Amazon. **IFS, Provisional Report Series**, pp. 84-100, 1987.

ELISABETSKY, E.; FIGUEIREDO, W.; OLIVEIRA, G. Traditional Amazonian nerve tonics as antidepressant agents: *Chaunochiton kapleri*, a case study. **J. Herbs Spices Med. Plants.**, 1:125-162, 1992.

EMRE, M.; GEULA, C.; RANSIL, B.J.; MESULAM, M.M. The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. **Neurobiol. Aging**, 13:553-559, 1992.

EVANS, D.A.; HEBERT, L.E.; BECKETT, L.A.; SCHERR, P. A.; ALBERT, M.S.; CHOWN, M. J.; PILGRIM, D.M.; TAYLOR, J. O Education and other measures of socioeconomic status and risk of incident Alzheimer disease in a defined population of older persons. **Arch. Neurol.**, 54:1399-1405, 1997.

FIGUEIRÓ, M.; ILHA, J.; POCHMANN, D.; PORCIÚNCULA, L.O.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal. **Phytomedicine (in press)**, 2010.

FONSECA, C.A. **Plantas Afrodisíacas**. Iao Livraria & Editora Ltda, Brasil, pp.32, 1981.

FORLENZA, O.V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev. Psiq. Clín.**, 32(3):137-148, 2005.

FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 66:137-147, 1999.

GARRIDO, R.; MENEZES, P.R. O Brasil está envelhecendo: boas e más notícias por uma perspectiva epidemiológica. **Rev. Bras. Psiquiatria**, 24(1):3-6, 2002.

GARZON, D.J.; FAHNESTOCK, M. Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. **J. Neurosci.**, 27:2628-2635, 2007.

GRAUS, Y.M.; DE BAETS, M.H. Myasthenia gravis: an autoimmune response against the acetylcholine receptor. **Immunol. Res.**, 12(1):78-100, 1993.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **Eur. J. Biochem.**, 264:672-686, 1999.

HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, 297:353-356, 2002.

HEBERT, L.E.; SCHERR, P.A.; BIENIAS, J.L.; BENNETT, D.A.; EVANS, D.A. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. **Arch. Neurol.**, 60(8):1119- 22, 2003.

HEINONEN, O.; LEHTOVIRTA, M.; SOININEN, H.; HELISALMI, S.; MANNERMAA, A.; SORVARI, H.; KOSUNEN, O.; PALJÄRVI, L.; RYYNÄNEN, M.; RIEKKINEN, P.J. Alzheimer pathology of patients carrying apolipoprotein E epsilon 4 allele. **Neurobiol. Aging**, 16(4):505-513, 1995.

HERRERA, E.Jr.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A.S.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, 16(2):103-8, 2002.

HOEY, R. Experts disagree over NICE's approach for assessing drugs. **Lancet**, 370:643-644, 2007.

HOFFMANN, H.; GREMME, T.; HATT, H.; GOTTMANN, K. Synaptic activity-dependent developmental regulation of NMDA receptor subunit expression in cultured neocortical neurons. **J. Neurochem.**, 75(4):1590-1599, 2000.

HOUGHTON, P.J. Plants and central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 75:497-499, 2003.

HYE, A.; KERR, F.; ARCHER, N.; FOY, C.; POPPE, M.; BROWN, R.; HAMILTON, G.; POWELL, J.; ANDERTON, B.; LOVESTONE, S. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, 373(1):1-4, 2005.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L.A.; VIANNA, M.R.; CAMMAROTA, M. Neurobiologia da Memória. IN: Demência. Abordagem Multidisciplinar. Ed. L. Caixeta. São Paulo, Atheneu, pp. 31-44, 2007.

JANN, M.V. Pharmacology and clinical efficacy of cholinesterase inhibitors. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, 55(2):S22-5, 1998.

JARVIS, B.; FIGGITT, D.P. Memantine. **Drugs Aging**, 20(6):465-476, 2003.

JELLINGER, K.A. Clinico pathological analysis of dementia disorders in the elderly: an update. **J. Alzheimer's Dis.**, 9(3):61-70, 2006.

JENNER, P.; SCHAPIRA, A. H. V.; MARSDEN, C. D. New insights into the cause of Parkinson's disease. **Neurology**, 42:2241, 1992.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacol. Ther.**, 86:29-48, 2000.

KENNEDY, D.O.; SCHOLEY, A.B.; WESNES, K.A. The dose-dependent cognitive effects of acute administration of *Ginkgo biloba* to healthy young volunteers. **Psychopharmacology (Berl)**, 151(4):416-423, 2000.

KIMURA, N.; TAKAHASHI, M.; TASHIRO, T.; TERAOKA, K. Amyloid beta up-regulates brain derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta related neuritic degeneration. **J. Neurosci. Res.**, 84:782-789, 2006.

KOISTINAHO, M.; ORT, M.; CIMADEVILLA, J.M.; VONDROUS, R.; CORDELL, B.; KOISTINAHO, J.; BURES, J.; HIGGINS, L.S. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid deposits but do not form plaques. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 98:675-680, 2001.

KOSASA T.; KURIYA, Y.; MATSUI, K.; YAMANISHI, Y. Inhibitory effects of donepezil hydrochloride (E2020) on cholinesterase activity in brain and peripheral tissues of young and aged rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 386(1):7-13, 1999.

LANCTÔT, K.L.; HERRMANN, N.; YAU, K.K.; KHAN, L.R.; LIU, B.A.; LOULOU, M.M.; EINARSON, T.R. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimers disease: a meta-analysis. **CMAJ.**, 169(6):557-564, 2003.

LANCTÔT, K.L.; HERRMANN, N.; ROTHENBURG, L.S. Commentary: A $\beta$ (1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT<sub>2A</sub> levels. **Exp. Neurol.**, 212:251-254, 2008.

LANE, R.M.; KIVIPELTO, M.; GREIG, N.H. Acetylcholinesterase and Its Inhibition in Alzheimer Disease. **Clin. Neuropharmacol.**, 27:141-149, 2004.

LANE, R.M.; POTKIN, S.G.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, 9:101-124, 2006.

LAUNER, L.J.; ANDERSEN, K.; DEWEY, M.E.; LETENNEUR, L.; OTT, A.; AMADUCCI, L.A.; BRAYNE, C.; COPELAND, J.R.; DARTIGUES, J.F.; KRAGH-SORENSEN, P.; LOBO, A.; MARTINEZ-LAGE, J.M.; STIJNEN, T.; HOFMAN, A. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease. **Neurology**, 52:78-84, 1999.

LE BARS, P.L.; KATZ, M.M.; BERMAN, N.; ITIL, T.M.; FREEDMAN, A.M.; SCHATZBERG, A.F. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of *Ginkgo biloba* for dementia. North American EGb Study Group. **JAMA**, 278(16):1327-1332, 1997.

LE BARS, P.L.; VELASCO, F.M.; FERGUSON, J.M.; DESSAIN, E.C.; KIESER, M.; HOERR, R. Influence of the severity of cognitive impairment on the effect of the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in Alzheimer's disease. **Neuropsychobiology**, 45(1):19-26, 2002.

LE BARS, P.L. Response patterns of EGb 761 in Alzheimer's disease: influence of neuropsychological profiles. **Pharmacopsychiatry**, 36:S50-S55, 2003.

LEWCZUK, P.; BECK, G.; GANSLANDT, O.; ESSELMANN, H.; DEISENHAMMER, F.; REGENITER, A.; PETEREIT, H.F.; TUMANI, H.; GERRITZEN, A.; OSCHMANN, P.; SCHRODER, J.; SCHONKNECHT, P.; ZIMMERMANN, K.; HAMPEL, H.; BURGER, K.; OTTO, M.; HAUSTEIN, S.; HERZOG, K.; DANNENBERG, R.; WURSTER, U.; BIBL, M.; MALER, J.M.; REUBACH, U.; KORNUBER, J.; WILTFANG, J. International quality control survey of neurochemical dementia diagnostics. **Neurosci. Lett.**, 409:1-4, 2006.

LEYHE, T.; STRANSKY, E.; ESCHWEILER, G.W.; BUCHKREMER, G.; LASKE, C.  
Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early  
Alzheimer's disease. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, 258:124-128, 2008.

LOEWI, O.; NAVRATIL, E. Uber humorale Ubertragbarkeit der Herznervenwirkung. XIU  
berden Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. **Pflügers  
Archives**, 214:689-696, 1926.

LOVESTONE, S.; REYNOLDS, C.H. The phosphorylation of tau: a critical stage in  
neurodevelopment and neurodegenerative processes. **Neuroscience**, 78(2):309-324, 1997.

LUCHSINGER, J.A.; MAYEUX, R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease.  
**Curr. Atheroscler. Rep.**, 6(4):261-266, 2004.

LUO, Y. *Ginkgo biloba* neuroprotection: therapeutic implications in Alzheimer's disease. **J.  
Alzheimer's Dis.**, 3(4):401-407, 2001.

LUO, Y.; SMITH, J.V.; PARAMASIVAM V.; BURDICK, A.; CURRY, K.J.; BUFORD, J.P.;  
KHAN, I.; NETZER, W.J.; XU, H.; BUTKO, P. Inhibition of amyloid-beta aggregation and  
caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract Egb761. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**,  
99(19):12197-12202, 2002.

MARTINEZ-CORIA, H.; GREEN, K.N.; BILLINGS, L.M.; KITAZAWA, M.; ALBRECHT,  
M.; RAMMES, G.; PARSONS, C.G.; GUPTA, S.; BANERJEE, P.; LAFERLA, F.M.  
Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic  
mice. **Am. J. Pathol.**, 176(2):870-880, 2010.

MASLIAH, E.; CREWS, L.; HANSEN, L. Synaptic remodeling during aging and in  
Alzheimer's disease. **J. Alzheimer's Dis.**, 9(3):91-99, 2006.



MASSOULIÈ, J.; ANSELMET, A.; BON, S.; KREJCI, E.; LEGAY, C.; MOREL, N.; SIMON, S. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. **Chem. Biol. Interact.**, 119-120:29-42, 1999.

MASSOULIÈ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Prog. Neurobiol.**, 41:31-91, 1993.

MAYEUX, R.; HONIG, L.S.; TANG, M.X.; MANLY, J.; STERN, Y.; SCHUPF, N.; MEHTA, P.D. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. **Neurology**, 61(9):1185-1190, 2003.

MENDES, F.R.; CARLINI, E.A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, 109:493-500, 2007.

MESULAM, M.M. Aging, Alzheimer's Disease, and Dementia: Clinical and Neurobiological Perspectives. IN: **Principles of Behavioral and Cognitive Neurology**. Ed. M.-M.Mesulam, 2<sup>a</sup> ed. Oxford, Oxford University Press, pp. 439-522, 2000.

MESULAM, M.M.; GEULA, C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. **Ann. Neurol.**, 36(5):722-727, 1994.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, 110:627-639, 2002.

MICHALEK, H.; FORTUNA, S.; VOLPE, M.T.; PINTOR, A. Age-related differences in the recovery rate of brain cholinesterases, choline acetyltransferase and muscarinic acetylcholine receptor sites after a subacute intoxication of rats with the anticholinesterase agent,

isofluorophate. **Acta Neurobiol. Exp.**, 50:237-249, 1990.

MISZTAL, M.; FRANKIEWICZ, T.; PARSONS, C.G.; DANYSZ, W. Learning deficits induced by chronic intraventricular infusion of quinolinic acid-protection by MK-801 and memantine. **Eur. J. Pharmacol.**, 296(1):1-8, 1996.

MIX, J.A.; CREWS, W.D. Jr. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in a sample of cognitively intact older adults: neuropsychological findings. **Hum. Psychopharmacol.**, 17(6):267-277, 2002.

MORTIMER, A.M.; MARTIN, M.; WHEELER-VEGA, J.A.; TYSON, P.J. Conventional antipsychotic prescription in unipolar depression, II: withdrawing conventional antipsychotics in unipolar, nonpsychotic patients. **J. Clin. Psychiatry.**, 64(6):668-672, 2003.

MUCKE, L.; MASLIAH, E.; YU, G.Q.; MALLORY, M.; ROCKENSTEIN, E.M.; TATSUNO, G. HU, K.; KHOLODENKO, D.; JOHNSON-WOOD, K.; MCCONLOGUE, L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. **J. Neurosci.**, 20:4050-4058, 2000.

NITTA, A.; TUKTTA, T.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Continuous infusion of  $\beta$ -amyloid protein into the rat cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration. **Jpn. J. Pharmacol.**, 73:51-57, 1997.

OAKLEY, H.; COLE, S.L.; LOGAN, S.; MAUS, E.; SHAO, P.; CRAFT, J.; GUILLOZET-BONGAARTS, A.; OHNO, M.; DISTERHOFT, J.; VAN ELDIK, L.; BERRY, R.; VASSAR, R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. **J. Neurosci.**, 26:10129-10140, 2006.

O'NEILL, M. Screening plants for leads to novel medicines. **J. Pharm. Med.**, 12:211-217, 1998.

PANTEV, M.; RITTER, R.; GÖRTELMAYER, R. Clinical and behavioural evaluation in long-term care patients with mild to moderate dementia under Memantine treatment. **Zeitschrift für Gerontopsychologie und Psychiatrie**, 6:103-107, 1993.

PARDRIDGE, W.M. Drug targeting to the brain. **Pharm. Res.**, 24(9):1733–1744, 2007.

PARDRIDGE, W.M. Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood–brain barrier. **Alzheimer's Dement.**, 5(5):427-432, 2009.

PAXINOS, G. **The rat nervous System. Forebrain and midbrain.** Academic press Australia, pp. 487-508, 1985.

PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULLER, M. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture. IN: *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Oxford University Press, Oxford, 1991.

PERRY, E.K.; MARTIN-RUIZ, C.M.; COURT, J.A. Nicotinic receptor subtypes in human 470 brain related to aging and dementia. **Alcohol**, 24(2):63-68, 2001.

PIATO, A.L.; RIZON, L.P.; MARTINS, B.S.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Marapuama) in mice. **Phytother. Res.**, 23:519-524, 2009.

PIATO, A.L.; DETANICO, B.C.; LINCK, V.M.; HERRMANN, A.P.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Anti-stress effects of the "tonic" *Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. **Phytomedicine**, 17(3-4):248-253, 2010.

PIMPLIKAR, S.W. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 41:1261-1268, 2009.

PRADO, M.A.M.; REIS, R.A.M.; PRADO, F.V.; MELLO, M.C.; GOMEZ, M.V.; MELLO, F.G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem. Int.**, 41:291-299, 2002.

PRINCE, M.; JACKSON, J. Alzheimer's Disease International. **World Alzheimer Report**, 2009.

PROUDFOOT, A. The early toxicology of physostigmine: a tale of beans, great men and egos. **Toxicol. Rev.**, 25(2):99-138, 2006.

RADDE, R.; DUMA, C.; GOEDERT, M.; JUCKER, M. The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, 35:S70-74, 2008.

RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. **Acta Biol. Hung.**, 54:183-189, 2003.

RAND, J.D. **Acetylcholine**. IN: Program in Molecular, Cell and Developmental Biology, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK 73104 USA, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Dependência e abuso de fármacos. IN: Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. (Ed). **Farmacologia**. Elsevier, São Paulo, Brasil, pp. 674-695, 2004.

RICHARD, F.; AMOUYEL, P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. **Eur. J. Pharmacol.**, 412(1):1-12, 2001.

RIGNEY, U.; KIMBER, S.; HINDMARCH, I. The effects of acute doses of standardized Ginkgo biloba extract on memory and psychomotor performance in volunteers. **Phytother. Res.**, 13(5):408-415, 1999.

ROCKWOOD, K. Size of the treatment effect on cognition of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 75(5):677-685, 2004.

SANGIRARDI, J. **Plantas Eróticas**. Editora Nórdica Ltda. Brasil, 217, 1981.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature Rev.**, 6:48-56, 2005.

SASTRE, J.; PALLARDO, F.V.; VINA, J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. **IUBMB Life**, 49(5):427-435, 2000.

SCHEGG, K.M.; HARRINGTON, L.S.; NEILSEN, S.; ZWEIG, R.M.; PEACOCK, J.H. Soluble and membrane-bound forms of brain acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, 13:697-704, 1992.

SCHEFF, S.W.; SPARKS, L.; PRICE, D.A. Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. **Ann. Neurol.**, 34(3):356-361, 1993.

SERGEANT, N.; DAVID, J.P.; LEFRANC, D.; VERMERSCH, P.; WATTEZ, A.; DELACOURTE, A. Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. **FEBS Lett.**, 412(3):578-582, 1997.

SELKOE, D.J. Clearing the brain's amyloid cobwebs. **Neuron**, 32:177-180, 2001.

SIEK, G.C.; KATZ, L.S.; FISHMAN, E.B.; KOROSI, T.S.; MARQUIS, J.K. Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain.

**Biol. Psychiatry**, 27:573-580, 1990.

SIQUEIRA, I.R.; LARA, D.R.; SILVA, D.; GAIESKI, F.S.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* Benth (olacaceae). **Phar. Biol.**, 36:327-334, 1998.

SIQUEIRA, I.R.; CORDOVA, C.A.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; ELISABETSKY, E.; NUNES, D.S.; NETTO, C.A. Antioxidant action of an ethanol extract of *Ptychopetalum olacoides*. **Phar. Biol.**, 40(5):374-379, 2002.

SIQUEIRA, I.R.; FOCESATTO, C.; DA SILVA, A.L.; NUNES, D.S.; BATTASTINI, A.M.; NETTO, C.A.; ELISABETSKY, E. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 75(3):645-650, 2003.

SIQUEIRA, I.R.; CIMAROSTI, H.; FOCESATTO, C.; NUNES, D.S.; SALBEGO, C.; ELISABETSKY, E.; NETTO, C.A. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. **Life Sci.**, 75(15):1897-1906, 2004.

SIQUEIRA, I.R.; FOCESATTO, C.; TORRES, I.L.S.; DA SILVA, A.L.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E.; NETTO, C.A. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. **Phytomedicine**, 14(11):763-769, 2007.

SKOVRONSKY, D.M.; LEE, V.M-Y.  $\beta$ -Secretase revealed: starting gate for race to novel therapies for Alzheimer's disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, 21(5):161-163, 2000.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase- new roles for an old actor. **Nature Rev. Neurosci.**, 2:294-302, 2001.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memory: From Mind to Molecules**. New York, W. H. Freeman, 2000.

STEDMAN, E.; EASSON, L.H. Cholineesterase: An enzyme present in the blood serum of the horse. **Biochem. J.**, 26:2056-2066, 1932.

STEINMETZ, E. Muir puama (potency wood). **Quarterly J. Crude Drug Res.**, 2:229-232, 1962.

SUNDERLAND, T.; LINKER, G.; MIRZA, N.; PUTNAM, K.T.; FRIEDMAN, D.L.; KIMMEL, L.H.; BERGESON, J.; MANETTI, G.J.; ZIMMERMANN, M.; TANG, B.; BARTKO, J.J.; COHEN, R.M. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. **JAMA**, 289(16):2094-2103, 2003.

TAKADA, L.T.; CARAMELLI, P.; RADANOVIC, M.; ANGHINAH, R.; HARTMANN, A.P.; GUARIGLIA, C.C.; BAHIA, V.S.; NITRINI, R. Prevalence of potentially reversible dementias in a dementia outpatient clinic of a tertiary university-affiliated hospital in Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 61(4):925-929, 2003.

TANG, Y.; YAMADA, K.; KANOU, Y.; MIYAZAKI, T.; XIONG, X.; KAMBE, F.; MURATA, Y.; SEO, H.; NABESHIMA, T. Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid in rats. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, 80:188-197, 2000.

TARIOT, P.N.; FARLOW, M.R.; GROSSBERG, G.T.; GRAHAM, S.M.; MCDONALD, S.; GERGEL, I. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. **JAMA**, 291(3):317-324, 2004.

TAYLOR, P.; BROWN, J.H. Acetylcholine. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and*

Medical Aspects. IN: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W.; Molinoff, P.B. (Ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, pp. 214-242, 1999.

TONG, L.; BALAZS, R.; THORNTON, P.L.; COTMAN, C.W. Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. **J. Neurosci.**, **24**:6799-6809, 2004.

VAN ELDIK, L.J. Glia and Alzheimer's disease. **Neurochem. Int.**, 396:329-331, 2001.

VAN MARUM, R.J. Current and future therapy in Alzheimer's disease. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 22:265-274, 2008.

VELLAS, B.; ANDRIEU, S.; SAMPAIO, C.; WILCOCK, G. Disease modifying trials in Alzheimer's disease: a European task force consensus. **Lancet Neurol.**, 6:56-62, 2007.

VON STRAUSS, E.M.; VIITANEN, D.; DE RONCHI, D.; WINBLAD, B.; FRATIGLIONI, L. Aging and the occurrence of dementia. **Arch. Neurol.**, 56:587-592, 1999.

WANG, R.; ZHANG, H.Y.; TANG, X.C. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by  $\beta$ -amyloid protein (1-40) in rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 21:149-156, 2001.

WANG, R.; YAN, H.; TANG, X.C. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. **Acta Pharmacol. Sin.**, 27:1-26, 2006.

WENK, G.L.; QUACK, G.; MOEBIUS, H.J.; DANYSZ, W. No interaction of memantine with acetylcholinesterase inhibitors approved for clinical use. **Life Sci.**, 66(12):1079-1083, 2000.

WHITEHOUSE, P.J.; PRICE, D.L.; CLARK, A.W.; COYLE, J.T.; DELONG, M.R. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis



**Ann. Neurol.**, 10(2):122-126, 1981.

WHITMER, R.A.; SIDNEY, S.; SELBY, J.; JOHNSTON, S.C.; YAFFE, K. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. **Neurology**, 64(2):277-281, 2005.

YAARI, R.; COREY-BLOOM, J. Alzheimer's disease. **Semin. Neurol.**, 27(1):32-41, 2007.

YOUDIM, M.B.H.; BUCCAFUSCO, J.J. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. **Trends Pharmacol. Sci.**, 26:27-35, 2005.

YOUNGKEN, H.W. Muira-puama. **Am. J. Pharmacol.**, 625-627, 1921.

SHU, Y.-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, 61:1053-1071, 1998.

ZHANG, H.Y.; TANG, X.C. Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, 27:619-625, 2006.

ZHANG, Y.H.; ZHAO, X.Y.; CHEN, X.Q.; WANG, Y.; YANG, H.H.; HU, G.Y. Spermidine antagonizes the inhibitory effect of huperzine A on [3H]dizocilpine (MK-801) binding in synaptic membrane of rat cerebral cortex. **Neurosci. Lett.**, 319:107-110, 2002.

ZHAO, Q.; TANG, X.C. Effects of huperzine A on s-acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **Eur. J. Pharmacol.**, 455:101-107, 2002.

ZHOU, L.J.; ZHU, X.Z. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 293(3):982-988, 2000.