

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**SELEGILINA REVERTE A PIORA DA MEMÓRIA INUZIDA POR $A\beta_{25-35}$
EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE DA MAO-B**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andréia Martini Pazini

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**SELEGILINA REVERTE A PIORA DA MEMÓRIA INUZIDA
POR $A\beta_{25-35}$ EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DA
ATIVIDADE DA MAO-B**

Andréia Martini Pazini

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Maribel Antonello Rubin
Co-Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira**

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de ciências da saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SELEGILINA REVERTE A PIORA DA MEMÓRIA INUZIDA POR $A\beta_{25-35}$
EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE DA MAO-B**

elaborada por
Andréia Martini Pazini

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maribel A. Rubin (UFSM)
(Presidente Orientadora)

Profa. Dra. Roselei Fachinetto (UFSM)

Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra (UTFPR)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013

Até O Fim

Engenheiros do Hawaii

*Não vim até aqui
Pra desistir agora
Entendo você
Se você quiser ir embora
Não vai ser a primeira vez
Nas últimas 24 horas
Mas eu não vim até aqui
Pra desistir agora*

*Minhas raízes estão no ar
Minha casa é qualquer lugar
Se depender de mim
Eu vou até o fim
Voando sem instrumentos
Ao sabor do vento
Se depender de mim
Eu vou até o fim*

*Eu não vim até aqui
Pra desistir agora
Entendo você
Se você quiser
Ir embora
Não vai ser a primeira vez
Em menos de 24 horas*

*A ilha não se curva
Noite adentro
Vida afora
Toda a vida
O dia inteiro
Não seria exagero
Se depender de mim
Eu vou até o fim*

*Cada célula
Todo fio de cabelo
Falando assim
Parece exagero
Mas se depender de mim
Eu vou até o fim*

*Não vim até aqui pra desistir agora
Não vim até aqui pra desistir agora*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Maribel Rubin, pela orientação, pela oportunidade e pelos seus conhecimentos, mas principalmente pelo apoio e compreensão. Obrigada!

Ao meu co-orientador, professor Juliano Ferreira, que desde o início dedicou confiança em mim, ajudando-me de forma ímpar com seus conhecimentos, pela oportunidade, pela orientação e pelo exemplo de profissional que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha família pelo apoio e pelo incentivo em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda e pela amizade, em especial ao Jardel, Guilherme, Gerusa, Francielle, Ana Paula e Gustavo. Obrigada pela ajuda!

À minha querida amiga Sara pela força e por todos os momentos especiais compartilhados.

Ao amor da minha vida, Christopher, pelo companheirismo, pela paciência, pelo apoio, pelo amor e pela presença constante em todos os momentos.

Ao Biotério Central pelo fornecimento dos animais de laboratório.

Aos animais utilizados, todo o meu respeito, pois sem eles não teria sido possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que, de diferentes formas, contribuíram para a minha formação científica.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

SELEGILINA REVERTE A PIORA DA MEMÓRIA INUZIDA POR $A\beta_{25-35}$ EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE DA MAO-B

Autora: Andréia Martini Pazini
Orientadora: Maribel Antonello Rubin
Co-Orientador: Juliano Ferreira
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013.

A doença de Alzheimer (DA) é bioquimicamente caracterizada por depósitos extracelulares de peptídeo beta amiloide ($A\beta$) e de proteína tau hiperfosforilada, que são causalmente relacionadas com as características patológicas, placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares. A atividade da monoamina oxidase B (MAO-B), uma enzima envolvida na oxidação de monoaminas biogênicas, é particularmente elevada ao redor das placas senis e aumenta nos pacientes com DA em estágios clínicos de moderado a grave. A selegilina, um inibidor seletivo e irreversível da MAO-B, é relatada por melhorar a memória e o aprendizado em pacientes com DA. Porém, seu mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido. O presente estudo teve como objetivo investigar se a selegilina melhora o déficit cognitivo induzido por $A\beta_{25-35}$ na tarefa de reconhecimento de objetos em camundongos. Além disso, investigou-se a atividade da MAO-A e da MAO-B no hipocampo, no córtex cerebral e no córtex perirrinal de camundongos injetados com $A\beta_{25-35}$ e com selegilina. Administração aguda (1 e 10 mg/kg, p.o., imediatamente pós-treino) e subcrônica (10 mg/kg, p.o., por sete dias depois da injeção do $A\beta_{25-35}$ e imediatamente pós-treino) de selegilina preveniu o prejuízo da memória induzido pelo $A\beta_{25-35}$ (3 nmol, icv). A administração aguda de selegilina (1 mg/kg, p.o.) em combinação com $A\beta_{25-35}$ (3 nmol) diminuiu a atividade da MAO-B no córtex perirrinal e córtex cerebral. A administração aguda de selegilina (10 mg/kg, p.o.) diminuiu a atividade da MAO-B no hipocampo, no córtex cerebral e no córtex perirrinal independentemente da presença de $A\beta_{25-35}$. A atividade da MAO-A não foi alterada pelo tratamento com selegilina ou $A\beta_{25-35}$ em nenhuma das estruturas estudadas. Em resumo, os dados atuais suportam um papel adicional para a MAO-B no déficit cognitivo observado na DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Inibidores da MAO; MAO-B; Córtex Perirrinal; Memória de Reconhecimento de Objetos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduation Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

SELEGILINE REVERSES A β ₂₅₋₃₅-INDUCED MEMORY DEFICITS IN MICE: INVOLVMENT OF MAO-B ACTIVITY

Author: Andréia Martini Pazini
Advisor: Maribel Antonello Rubin
Co-Advisor: Juliano Ferreira

Place and date of the defense: Santa Maria, February, 28th, 2013.

Alzheimer's disease (AD) is biochemically characterized by the occurrence of extracellular deposits of amyloid beta peptide (A β) and intracellular deposits of the hyperphosphorylated tau protein, which are causally related to the pathological hallmarks senile plaques and neurofibrillary tangles. Monoamine oxidase B (MAO-B) activity, an enzyme involved in the oxidation of biogenic monoamines, is particularly high around the senile plaques and increased in AD patients in middle to late clinical stages of the disease. Selegiline, a selective and irreversible MAO-B inhibitor, improves learning and memory in AD patients. Notwithstanding, its mechanism of action is still not completely known. The current study aimed to investigate whether selegiline improves the A β ₂₅₋₃₅-induced cognitive deficit in the object recognition task in mice. In addition, we investigated whether selegiline alters MAO-B and MAO-A activities in the hippocampus, perirhinal and remaining cerebral cortices of A β ₂₅₋₃₅-injected mice. Acute (1 and 10 mg/kg, p.o., immediately post-training) and subchronic (10 mg/kg, p.o., seven days after A β ₂₅₋₃₅ injection and immediately post-training) administration of selegiline reversed the cognitive impairment induced by A β ₂₅₋₃₅ (3 nmol, i.c.v.). Acute administration of selegiline (1 mg/kg, p.o.) in combination with A β ₂₅₋₃₅ (3 nmol) decreased MAO-B activity in the perirhinal and remaining cerebral cortices. Acute administration of selegiline (10 mg/kg, p.o.) decreased MAO-B activity in hippocampus, perirhinal and remaining cerebral cortices, regardless of A β ₂₅₋₃₅ or A β ₃₅₋₂₅ treatment. MAO-A activity was not altered by selegiline or A β ₂₅₋₃₅. In summary, the current findings further support a role for MAO-B in the cognitive deficits observed in AD.

Keywords: Alzheimer's Disease; MAO Inhibitors; MAO-B; Perirhinal Cortex; Memory; Object Recognition.

LISTA DE ABREVIATURAS

Aβ	Peptídeo β amiloide
APP	Proteína precursora amiloide
BHE	Barreira hematoencefálica
DA	Doença de Alzheimer
FAD	Dinucleotídeo flavina-adenina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
LTM	Memória de longa duração
MAO	Monoamina oxidase
MAO-A	Monoamina oxidase tipo A
MAO-B	Monoamina oxidase tipo B
MTL	Lobo temporal medial
NFT	Emaranhados neurofibrilares
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNC	Sistema nervoso central
STM	Memória de curta duração
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Causas de demências	3
Figura. 2 - Processo proteolítico da proteína precursora amiloide (Liu, Smith et al.)	9
Figura 3 - APP e proteína beta amiloide	10
Figura 4 - Alteração da proteína Tau e desenvolvimento de novos neurofibrilares.....	11
Figura 5 - Vista medial do lobo temporal direito, juntamente com a representação esquemática das estruturas cerebrais.....	12
Figura 6 - Esquema da reação catalisada pela MAO.....	15
Figura 7 - Estrutura da MAO-A (A) e da MAO-B (B) humanas.....	17
Figura 8 - Estruturas da clorogilina e selegilina.....	20

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
APRESENTAÇÃO	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Alzheimer.....	3
1.2 Estágios Clínicos	4
1.2.1 Primeiro estágio: falhas na memória	4
1.2.2 Segundo estágio: afasia, apraxias entre outras	7
1.2.3 Terceiro estágio: perda de marcha	7
1.3. Neuropatologia da Doença de Alzheimer	8
1.3.1 β -amilóide ($A\beta$)	8
1.3.2 Emaranhados neurofibrilares	10
1.4 Regiões cerebrais envolvidas na DA	11
1.5 Monoamina oxidase.....	14
1.5.1 Definições e funções.....	14
1.6 MAO-A e da MAO-B e sua características	16
1.6.1 Seletividade de Substratos	18
1.7 Monoamina oxidase B e Doença de Alzheimer	19
1.8 Inibidores da MAO	19
2 OBJETIVOS	22
3 MANUSCRITO	24
4 CONCLUSÕES	46
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

APRESENTAÇÃO

Na introdução desta dissertação estão brevemente descritos os temas abordados nesta. Os métodos, resultados e discussão, que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito submetido para publicação. As referências bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O aumento significativo da população de idosos nos últimos anos em decorrência da elevação da expectativa de vida tem como principal consequência o aumento da prevalência das demências. A demência é uma síndrome que pode ser causada por um grande número de doenças que afetam a memória, o comportamento e a habilidade para realizar atividades rotineiras e tornou-se um dos maiores problemas de saúde da população idosa, tendo como prevalência dobrada a cada 5 anos após os 60 anos de idade (Norton, Matthews *et al.*, 2013).

Segundo projeções estatísticas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2011), a expectativa de vida da população em 2011 era de 74 anos, todavia esse aumento da expectativa de vida nem sempre é acompanhado de aumento na qualidade de vida. Geralmente, as doenças nos idosos são crônicas e múltiplas, desse modo, necessitam cuidados médicos eficientes e constantes.

No Brasil, o aumento da proporção de idosos começou a ser verificado em 1960 e vem ocorrendo de maneira muito rápida, com estimativas para que entre 1960 a 2025, o Brasil passe da 16^a para a 6^a posição mundial em termos de número absoluto de indivíduos com 60 anos ou mais (Kaleche e Veras, 1987). Estas mudanças preocupam considerando as condições econômicas e sociais não apenas no Brasil, mas em todo mundo.

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência que existe (Figura 1) entre as mais de sessenta demências existentes (Busatto Filho, 2007; George-Carey, Adeloje *et al.*, 2012), responde por cerca de 55 a 70% (isolada ou em associação) dos casos de demência (Jellinger, 2006; Petersen, 2006). Estimou-se que havia cerca de 35,6 milhões de pessoas com DA no mundo em 2010, e estima-se que em 2030 este número aumente para 65,7 milhões e em 2050 para 115,4 milhões de pacientes com DA (Prince, Bryce *et al.*, 2013).

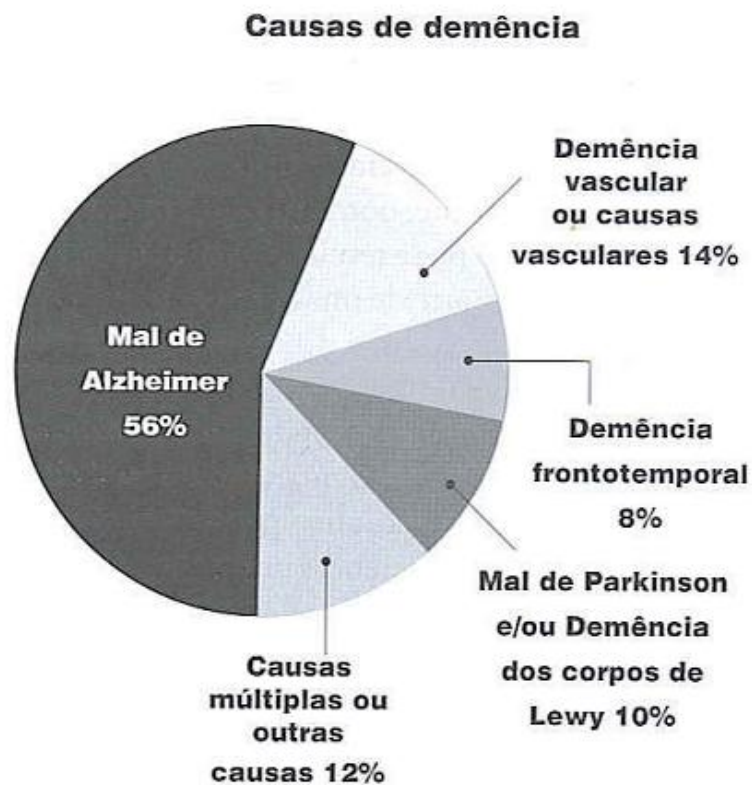


Figura 1 - Causas de demências.

Fonte: Adaptado de (Petersen, 2006).

1.1 Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa, caracterizada por comprometimentos cognitivos e comportamentais progressivos, como perda de memória, desorientação geográfica, deterioração da linguagem, mudanças de comportamento e complicações motoras, afetando o funcionamento ocupacional e funcional. Fatores genéticos e ambientais parecem contribuir para o desenvolvimento da doença, sendo a idade o principal fator de risco, e que atinge valores próximos de 40% nos grupos etários acima de 60 de idade (Martinez-Lage, 1998). Além da idade, são apontados como fatores de risco, deficiência de fatores neurotróficos, defeito mitocondrial, acúmulo de elementos neurotóxicos, aumento na formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, defeito no metabolismo energético e defeitos genéticos. Neste contexto, podemos classificar a DA em dois tipos: a DA de

acometimento tardio em que aparece a partir dos 60 anos de idade e que ocorre de forma esporádica, e a DA familiar de acometimento precoce ao redor de 40 anos (Kar, Slowikowski *et al.*, 2004; Spires e Hyman, 2005).

Clinicamente, a DA caracteriza-se por um início insidioso, um declínio cognitivo global, incluindo defeitos a nível da memória (especialmente para fatos recentes) e desorientação espacial, conduzindo eventualmente à morte (Caramelli e Barbosa, 2002). Estas características tornam a DA uma doença extremamente debilitante, não só para os doentes, como para os seus cuidadores.

1.2 Estágios Clínicos

Tipicamente, o curso clínico da DA envolve um início gradual e uma progressão lenta, sendo caracterizado por defeitos em uma gama de funções cognitivas. É possível reconhecer três estágios: o primeiro caracteriza-se por falhas na memória; no segundo se acrescentam as apraxias e no terceiro se adicionam também as alterações de tônus muscular com paratonia e rigidez (Donoso, 2003).

1.2.1 Primeiro estágio: falhas na memória

O primeiro e mais evidente sintoma que emerge em pacientes com DA é o déficit de memória episódica. A memória episódica refere-se à recordação de fatos e eventos recentes definidos no tempo e espaço. (Allegri, Harris *et al.*, 2001; Ávila, Parcet *et al.*, 2004; Hamdan e Bueno, 2005). É interessante esclarecer que as memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de retenção ou quanto à natureza do seu conteúdo (Mcgaugh, 2000; Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2002).

Em relação à natureza de seu conteúdo, as memórias podem ser classificadas em memórias declarativas ou explícitas e não declarativas ou implícitas. A memória implícita é a memória dos hábitos, procedimentos e regras, ou seja, contém informação a qual não temos acesso consciente. A memória explícita é exatamente o oposto, contém informação que usualmente sabemos que possuímos

e a qual temos acesso consciente e subdivide-se em episódica e em semântica (Mcgaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

As memórias episódicas são afetadas precocemente na DA (Collie e Maruff, 2000; Donoso, 2003; Bondi, Jak *et al.*, 2008). Estas memórias são as que possuem informações a respeito de nossa própria vida e eventos como, por exemplo, o dia que ganhei minha primeira bicicleta e o dia da minha festa de formatura (Nebes, Martin *et al.*, 1984). O déficit da memória episódica decorre de uma falha na aquisição e codificação de informações novas e a especificidade desta característica é mais saliente em testes de reconhecimento ou com auxílio de pistas semânticas (Mitrushina, Satz *et al.*, 1994; Christensen, Kopelman *et al.*, 1998).

As memórias semânticas são, normalmente, afetadas mais tardiamente na DA (Nebes, Martin *et al.*, 1984) e armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia (a farmacologia, a matemática, o português). Em testes, como enumerar animais em 60 segundos, é possível avaliar o déficit cognitivo envolvendo a memória semântica (Hodges e Patterson, 1995; Perry e Hodges, 1999; Charchat, Nitrini *et al.*, 2001).

As memórias semânticas costumam ser adquiridas através de episódios, o qual talvez explique o fato de que, basicamente, tanto as memórias episódicas como as semânticas utilizam o mesmo conjunto de sistemas ou núcleos centrais (hipocampo, córtex perirrinal, neocórtex temporal e fronto-parietal). Entretanto, em relação ao nível de interação entre ambos os tipos de memória declarativa existem apenas, de momento, hipóteses (Milner, Squire *et al.*, 1998; Squire e Kandel, 2002).

Além disso, na DA, tanto a memória a curto prazo como a memória a longo prazo são progressivamente afetadas. As memórias armazenadas por um curto período de tempo (segundos, minutos, poucas horas) são chamadas de memória de curta duração (STM) e as memórias mantidas por um longo período de tempo (muitas horas, dias, semanas, décadas) são chamadas de memória de longa duração (LTM) (Mcgaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

Este tipo de memória que perdura minutos ou poucas horas garante o sentido de continuidade do presente. A STM é a que nos permite ler um capítulo, um trecho de um texto ou uma crônica ou entender um evento (por exemplo, um filme, uma conversa) (Bonini, 2006).

Por outro lado, as LTM garantem o registro do passado autobiográfico, o dos conhecimentos, e o das habilidades motoras ou sensoriais do indivíduo, ou seja,

seus hábitos. Como mencionado anteriormente, as LTM duram muitas horas, dias ou até anos; neste último caso, podem se denominar memórias remotas (Mcgaugh, 2000; Izquierdo, 2002) que também está comprometida na DA (Donoso e Behrens, 2005).

Uma característica interessante da DA é que os transtornos da memória apresentam a particularidade de produzir dissociações entre os diferentes sistemas de memória. Ou seja, enquanto um sistema está completamente alterado, outros sistemas se encontram intactos, por exemplo, enquanto a memória episódica se encontra diminuída, a memória de procedimentos está conservada. O paciente não lembra onde guardou as chaves ou seus óculos (atividade que requer de uma atualização consciente da informação), mas não esquece a série de movimentos motores necessários para conduzir seu veículo (atividade automática que não requer atualização na consciência) (Lopera, 2001).

Além do prejuízo na memória existem falhas na atenção-concentração (inversão de séries, retenção de cifras) e da capacidade executiva. Se existir somente prejuízo de memória deve-se falar de uma síndrome amnésica e não de uma demência (Donoso e Behrens, 2005).

Neste primeiro estágio, o paciente pode apresentar transtornos do discurso: imprecisão ou perseverança no conteúdo, prejuízo de coerência, dificuldade na compreensão de discursos complexos, discreta anomia que é confundida com amnésia (Donoso e Behrens, 2005). O paciente tem dificuldade em pronunciar, por exemplo, nomes de animais ou palavras que começam por determinada letra (Mortimer, Ebbitt *et al.*, 1992). À medida que a demência progride, muitos doentes tornam-se disfágicos. No estágio moderado da doença, a linguagem torna-se completamente não fluente, a repetição é claramente afetada e o discurso deteriora-se até uma total afasia (Faber-Langendoen, Morris *et al.*, 1988).

1.2.2 Segundo estágio: afasia, apraxias entre outras

Neste estágio ocorrem defeitos na expressão, uma anomia evidente (desmoronamento das normas e dos valores vigentes em uma sociedade), parafasias fonêmicas ou semânticas (consiste na troca e na deformação de palavras), existindo uma progressão dos transtornos da linguagem e apraxia

(incapacidade para efetuar tarefas que requerem padrões de evocação ou seqüências de movimentos). Os primeiros sintomas da Síndrome de Gerstmann são a acalculia (na solução de problemas) e os transtornos da escrita; pobreza ou incoerência do discurso escrito, uma agrafia linguística (precede à afasia na linguagem oral). Depois se soma a desorientação direita-esquerda e agnosia digital (Donoso e Behrens, 2005).

Este estágio exige cuidados familiares constantes, pois o doente conserva a mobilidade e existe grande risco de acidentes (por exemplo: deixar o gás ligado ao tentar cozinhar) (Donoso e Behrens, 2005).

1.2.3 Terceiro estágio: perda de marcha

No terceiro estágio, estão presentes as alterações de tônus muscular com paratonia e rigidez. Conjuntamente se observa a perda da agilidade, a marcha é insegura, os passos são curtos, com escassos movimentos de braços e com evidente parkinsonismo. Inicialmente o paciente requer ajuda para caminhar e em seguida fica prostrado em uma cama ou em uma cadeira. Paralelamente, tem perda do controle dos esfíncteres. Neste último estágio, a família enfrenta uma situação grave e delicada, devido aos cuidados permanentes que são requeridos para atender o paciente totalmente dependente (Donoso e Behrens, 2005).

Nesta fase da doença, ocorrem nítidos defeitos a nível do campo visual e do espacial com maior envolvimento do hemisfério direito (Bayles, 1987; Mortimer, Ebbitt *et al.*, 1992). Os pacientes possuem dificuldade em colocar objetos nos seus locais adequados, assim como desorientação e dificuldade em tarefas como desenhar figuras complexas. Dificuldades nos cálculos, apraxia e agnosia são outros problemas que se desenvolvem com a DA.

1.3 Neuropatologia da Doença de Alzheimer

1.3.1 β -amilóide (A β)

O peptídeo β -amilóide (A β), com extensão de 40 a 42 aminoácidos (Hardy e Selkoe, 2002), desempenha um papel fundamental na DA (Hardy, 1991; Selkoe, 1994) e é formada a partir da proteína precursora amilóide (APP) (100–130 kDa) que apresenta uma região transmembrana, um grande domínio extracelular e uma pequena cauda intracelular encontrada preferencialmente nas terminações nervosas (Figura 2.). Esta proteína desempenha importantes funções no organismo, estando envolvida na sinalização celular, no transporte axonal, na apoptose, na sobrevivência celular, entre outras (Weidemann, König *et al.*, 1989). Entretanto, a APP foi descoberta não por seus efeitos morforeguladores no cérebro saudável, mas sim por causa da deposição de placas senis (neuríticas) contendo um fragmento proteolítico derivado dela, o peptídeo A β , em cérebros de pacientes dementes. O peptídeo A β é o maior constituinte destas placas (90%) (Dekosky, 2002).

A APP é produzida no SNC pelos neurônios, astrócitos, microglia, células endoteliais e células musculares lisas (Banati Rb, Gehrmann J *et al.*, 1993; Leblanc, Xue *et al.*, 1996). A síntese de APP encontra-se aumentada após diferentes tipos de lesões no SNC, no entanto, a DA não está associada com uma sobre-expressão generalizada desta proteína (Bahmanyar, Higgins *et al.*, 1987; Lewis, Higgins *et al.*, 1988).

A APP é degradada de diversas maneiras: por um lado, as enzimas α e γ -secretase a descompõem gerando o peptídeo inofensivo p3. Esta via previne a formação do A β e é considerada uma via não amiloidogênica (Busciglio, Gabuzda *et al.*, 1993; Dekosky, 2002). Por outro lado, o peptídeo A β deriva de uma via de clivagem quantitativamente menos expressiva do que a clivagem pela α -secretase, sendo gerado a partir da proteólise da APP pela ação sucessiva da β -secretase, que cliva a proteína do lado extracelular da membrana, no N-término da sequência amiloidogênica, e da γ -secretase, que cliva a proteína em várias ligações peptídicas no interior da membrana (Figura 2.). Este peptídeo possui importantes funções neurotróficas e sinalizadoras quando presente em baixas concentrações. Entretanto, os agregados amiloides que se formam *in vivo* ou *in vitro* em soluções aquosas de A β são potencialmente neurotóxicos (De Felice e Ferreira, 2002).

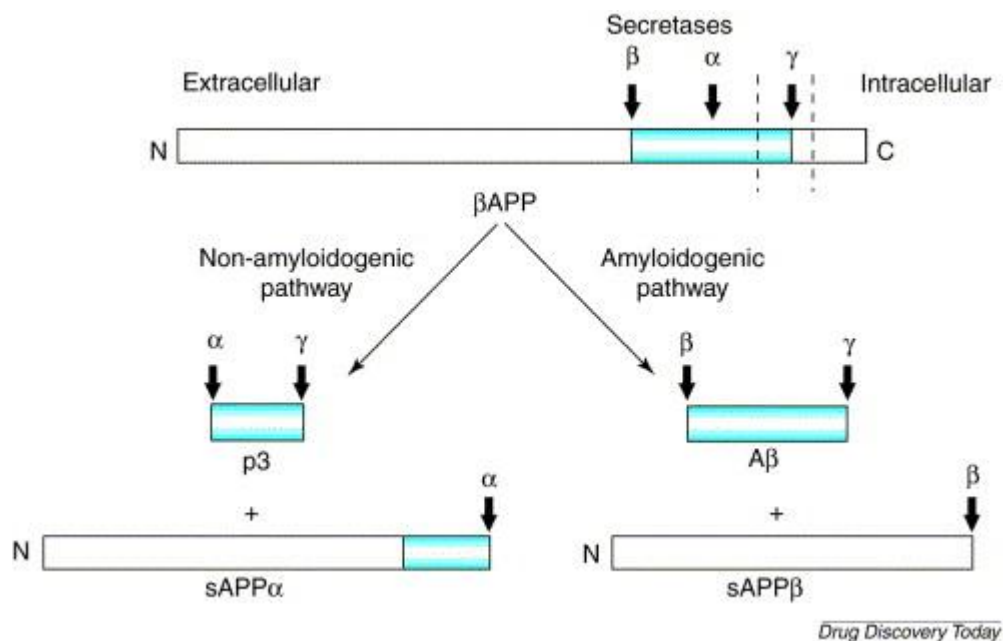


Figura 2 - Processo proteolítico da proteína precursora amiloide

Fonte: Adaptado de (Scorer, 2001).

Apesar da visível presença de placas senis em cérebros envelhecidos e, particularmente, nos cérebros de indivíduos afetados pela DA, o grau de demência em pacientes se correlaciona melhor com os níveis de Aβ no cérebro do que com a quantidade de Aβ agregada em placas (Figura 3) (Lue, Kuo *et al.*, 1999). Na DA existe um padrão de expansão desde as zonas temporais mediais em direção ao lobo temporal e desde estas regiões ao resto do córtex (Dekosky, 2002).

A espécie responsável pelos problemas dos pacientes com DA podem ser oligômeros solúveis de Aβ, que interferem na plasticidade sináptica, e talvez não os agregados fibrilares amilóides que foram inicialmente considerados como sendo as espécies neurotóxicas. Os oligômeros de Aβ estão presentes em concentrações muito mais altas no cérebro de pacientes com DA do que em cérebros não afetados e se ligam especificamente a uma sub-população de espinhas dendríticas (Lacor, Buniel *et al.*, 2004).

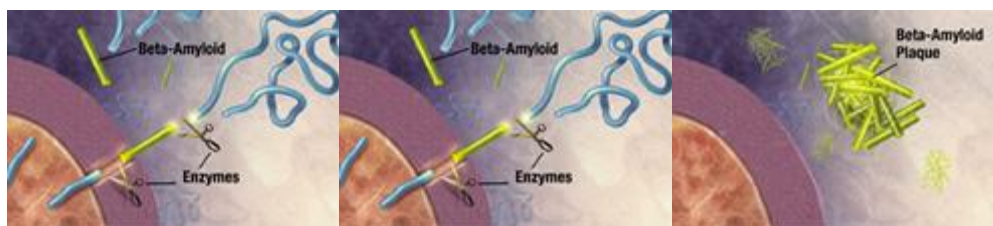


Figura 3 - APP e proteína-beta amilóide.

Fonte: www.alzheimermed.com.br.

1.3.2 Emaranhados neurofibrilares

Os emaranhados neurofibrilares (NFT) são formados principalmente por uma proteína microtubular hiperfosforilada chamada proteína Tau (Delacourte e Defossez, 1986; Hasegawa, Morishima-Kawashima *et al.*, 1992) (Figura 4). Não está totalmente elucidado o mecanismo que produz esta alteração, no entanto pessoas saudáveis de idade avançada podem desenvolver NFT, porém em menor quantidade (Dekosky, 2002).

Tem sido descrito que as placas amilóides e os NFT são encontrados em pequenas quantidades em indivíduos normais a partir dos 20 anos de idade, aumentando de volume com o passar dos anos, entretanto nunca atingindo graus tão elevados como visto na DA (Mizutani e Kasahara, 1997; Morrison e Hof, 1997; Price, Ko *et al.*, 2001). Deste modo, alguns autores acreditam que o resultado da doença é consequência de um aumento do quadro histológico.

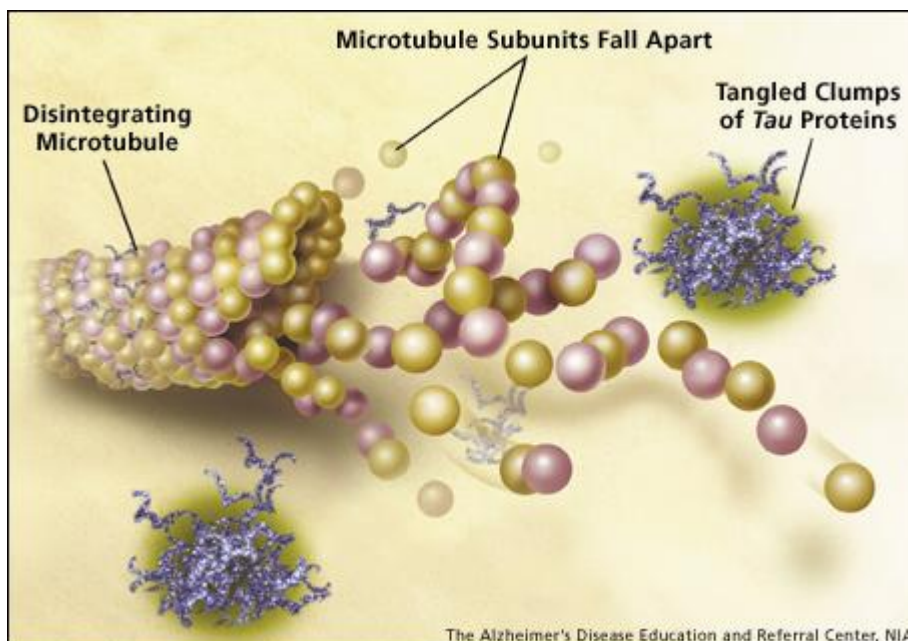


Figura 4 - Alteração da proteína Tau e desenvolvimento de emaranhados neurofibrilares.

Fonte: www.alzheimermed.com.br.

1.4 Regiões cerebrais envolvidas na DA

A neurodegeneração ocorre em múltiplas regiões do encéfalo de pacientes com DA, predominantemente no hipocampo, no córtex cerebral, na amígdala, no neocórtex, em várias áreas subcorticais, na rafe dorsal e no locus ceruleus (Kar, Slowikowski *et al.*, 2004). A perda de neurônios em grande escala rompe circuitos neuronais contribuindo para o declínio cognitivo. Os neurônios piramidais das projeções corticais são particularmente vulneráveis a esta morte, rompendo conexões corticais (Dekosky e Scheff, 1990; Morrison e Hof, 1997) como, por exemplo, a conexão entre córtex entorrinal e a formação hipocampal. Na região do subiculum e CA1 do hipocampo em média 70% dos neurônios morrem durante a progressão da doença (West, Coleman *et al.*, 1994). Os neurônios remanescentes passam por extensas mudanças morfológicas, entre elas distrofia neurítica, remodelação das árvores axônicas e da densidade dos espinhos dendríticos (Spires e Hyman, 2005). Todas essas mudanças alteram a conectividade dos circuitos da

memória e da cognição, sendo responsável pelos sintomas existentes na DA (Terry, Masliah *et al.*, 1991).

A DA, como mencionado anteriormente, é caracterizada pela deposição da proteína β -amilóide e de NFT, bem como por perda neuronal e sináptica. Em 85% dos casos de DA (Taylor e Probst, 2008), estes NFT se desenvolvem inicialmente no lobo temporal medial (MTL) (Braak e Braak, 1991; Delacourte, David *et al.*, 1999). O MTL é crucial para a memória declarativa (Cohen e Squire, 1980) e é composto por várias sub-regiões como hipocampo, córtex perirrinal, córtex entorrinal e córtex para-hipocampal.

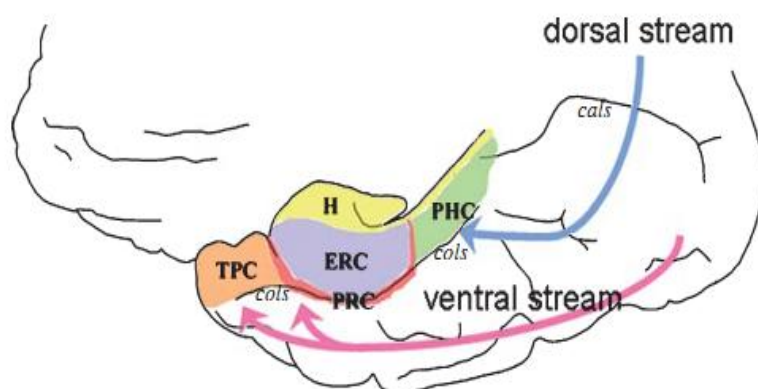


Figura 5 - Vista medial do lobo temporal direito, juntamente com a representação esquemática das estruturas cerebrais, H: hipocampo; ERC: córtex entorrinal; PRC: córtex perirrinal; TPC: córtex temporopolar; PHC: córtex para-hipocampal; cols: sulco colaterais; cals: sulco calcarino. Os limites posteriores do H e PHC não são representados. Nota-se que a PRC se encontra principalmente dentro do sulco colateral.

Fonte: Adaptado de (Barbeau, Didic *et al.*, 2004).

Vários estudos demonstram que os NFT se desenvolvem inicialmente na porção medial do córtex perirrinal, o córtex transentorrinal (TERC ou BA35), então alcançam o córtex entorrinal, antes de chegar no hipocampo e mais tarde afetam o neocórtex temporal (Braak e Braak, 1991; Delacourte, David *et al.*, 1999; Bennett, Schneider *et al.*, 2005). Os NFTs formam-se em regiões transitórias e se expandem totalmente para o córtex entorrinal e para o hipocampo (Braak e Braak, 1997), onde aparecem primeiramente na região CA1. Esta progressão aumenta até interromper o sistema de memória no lobo temporal, contribuindo para a perda da memória

(Klucken, Mclean *et al.*, 2003). A formação progressiva dos NFT (Morrison e Hof, 1997) tem relação direta com a evolução e com a gravidade da DA (Arriagada, Growdon *et al.*, 1992; Giannakopoulos, Herrmann *et al.*, 2003; Ingelsson, Fukumoto *et al.*, 2004).

As placas senis estão presentes desde o início da DA em estruturas do MTL, incluindo o hipocampo e o giro para-hipocampal, estruturas consideradas essenciais para o processo de memória (Forlenza, 2005). Com a evolução da doença o processo degenerativo se espalha para o neocórtex, área entorrinal, amígdala, núcleo basal e tálamo anterior (Hyman, Van Hoesen *et al.*, 1986; Zubenko, Moosy *et al.*, 1991).. Áreas límbicas e de associações corticais são mais suscetíveis do que o córtex sensorial primário. No neocórtex as camadas II e III são as mais suscetíveis para a formação de placas (Ingelsson, Fukumoto *et al.*, 2004). Admite-se que anos antes do início da demência já ocorra deposição do peptídeo nestas áreas.

O hipocampo, uma das principais regiões afetadas pela DA, troca sinais constantemente com todo córtex cerebral. No córtex cerebral ocorrem a maior parte das operações intelectuais, como o raciocínio, a organização, o planejamento, o pensamento e a tomada de decisões (Greenfield, 2000; Connors, Bear *et al.*, 2002). O córtex cerebral está relacionado com a memória de longo prazo, e o hipocampo com a memória recente, e tem o papel de receber e enviar informações para as regiões adequadas ao armazenamento (Petersen, 2006).

O hipocampo intacto possibilita a pessoa comparar condições atuais com experiências similares, permitindo-lhe escolher qual a melhor opção a ser tomada. A amnésia é consequência de lesão no hipocampo. Ela faz com que o indivíduo não consiga memorizar informações baseadas em simbolismos verbais, como os nomes das pessoas que conhece, por exemplo. Entretanto, é importante ressaltar que a memória passada permanece intacta. Quando ambos os hipocampos (direito e esquerdo) se degeneram, nada mais é gravado na memória, o que acarreta no rápido esquecimento da mensagem recém recebida (Treves e Samengo, 2002; Meunier e Barbeau, 2013).

O hipocampo é uma região do córtex cerebral, situada medialmente ao ventrículo lateral. Ventralmente ao hipocampo estão três importantes regiões corticais que cercam o sulco rinal; o córtex entorrinal; que ocupa a margem medial do sulco rinal, o córtex perirrinal; na margem lateral, e o córtex para-hipocampal, que situa-se lateralmente e posteriormente ao sulco rinal

Além disso, o hipocampo contribui claramente para o desempenho da tarefa de reconhecimento de objetos com a finalidade de orientação espacial e de reconhecer lugares, porém essa estrutura não parece ser necessária para o reconhecimento de familiaridade com base na informação do objeto em si. Já o córtex perirrinal parece ter um papel vital de reconhecer se algo em particular nos é novo ou familiar. Estudos sugerem que o hipocampo pode ser particularmente importante para ajudar a combinar a informação espacial ou contextual com informações sobre o objetivo específico processadas então, no córtex perirrinal (Aggleton e Brown, 1999; Bussey e Aggleton, 2002; Winters, Forwood *et al.*, 2004; Eacott e Gaffan, 2005; Eichenbaum, Yonelinas *et al.*, 2007).

1.5 Monoamina oxidase

1.5.1 Definição e funções

A monoamina oxidase (MAO) (E.C: 1.4.3.4) é uma enzima que contém um dinucleotídeo flavina-adenina (FAD) e catalisa a desaminação oxidativa de monoaminas, ou seja, ela elimina o radical amina, introduzindo em seu lugar o oxigênio. Os substratos da MAO são aminas biogênicas, como monoaminas neurotransmissoras (serotonina, norepinefrina, dopamina) e neuromoduladoras (β -feniletilamina), assim como monoaminas bioativas exógenas (tiramina) (Shih, Chen *et al.*, 1999).

Essa enzima está localizada na membrana externa da mitocôndria em neurônios, em células gliais, mas também pode ser encontrada nas plaquetas presentes no sangue e no fígado (Shih, Chen *et al.*, 1999). A MAO metaboliza aminas primárias, e também algumas aminas secundárias e terciárias (Campbell, 2000; Abell e Kwan, 2001; Lehnigner, 2002). A reação catalisada pela MAO envolve a desaminação de aminas primárias em aldeído e amônia e de aminas secundárias em aminas substituídas, com geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 6). O H_2O_2 , formado quando o cofator FAD é reoxidado pelo oxigênio, geralmente é inativado por enzimas como catalase e glutatona peroxidase. Porém, quando há um aumento na atividade ou expressão da MAO, o H_2O_2 em alta quantidade pode ser

convertido por íons Fe^{2+} em radicais hidroxilas (OH^{\cdot}) altamente reativos. Estes radicais são capazes de provocar efeitos deletérios que podem causar danos e morte neuronal. Já o aldeído formado é rapidamente metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase a metabólitos ácidos. Estes metabólitos ácidos (ácido 5-hidróxi-3-indol acético a partir de 5-HT, ou ácido 3,5-diidróxifenil acético a partir de dopamina) podem ser utilizados para medidas da atividade da MAO *in vitro* e *in vivo* (Youdim e Bakhle, 2006b).

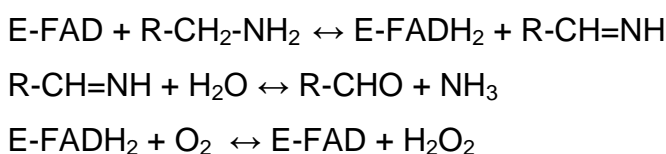


Figura 6 - Esquema da reação catalisada pela MAO. E-FAD: enzima ligada ao cofator FAD no estado oxidado; R-CH₂-NH₂: amina primária; E-FADH₂: cofator FAD reduzido; RCH=NH: amina; H₂O: água; R-CHO: ácido; NH₃: amônia; O₂: oxigênio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

Fonte: Adaptado de (Youdim e Bakhle, 2006b).

As monoaminas que servem como substratos para a MAO regulam processos envolvidos no movimento, na cognição, no humor, nas emoções, no aprendizado e na memória, por isso a MAO tem uma estreita relação com importantes funções cerebrais. Nos tecidos neuronais, a MAO participa da regulação dos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos e regula os estoques intracelulares de monoaminas. Nos tecidos periféricos, como intestino, fígado, pulmão e placenta, a MAO protege o organismo oxidando aminas provenientes do sangue ou prevenindo sua entrada na circulação sanguínea. Em microvasos da barreira-hemato-encefálica (BHE), por exemplo, a MAO possui função protetora agindo como barreira metabólica (Youdim, Edmondson *et al.*, 2006a). Outros estudos também mostram que a MAO contribui em processos apoptóticos, onde a inibição da atividade da enzima suprime a morte neuronal (De Zutter e Davis, 2001) ou ainda que o nível de atividade da MAO, determinado geneticamente, influencia aspectos da personalidade humana (Youdim, Edmondson *et al.*, 2006a).

1.6 MAO-A e da MAO-B e sua características

A MAO apresenta-se como duas isoformas: monoamina oxidase A (MAO-A) e monoamina oxidase B (MAO-B) que podem ter surgido através da duplicação de um mesmo gene ancestral. As duas isoformas são funcionalmente diferentes por sua seletividade a substratos e inibidores, e distribuição nos tecidos (Kanazawa, 1994).

A MAO-A e a MAO-B são codificadas por dois genes diferentes, localizados no cromossomo X (Xp11.23), cada uma compreendendo 15 éxons com idêntica organização introns-exóons (Grimsby, Chen *et al.*, 1991). A MAO-A e a MAO-B humanas são constituídas por 527 e 520 aminoácidos, respectivamente, e apresentam 70% da sequência de aminoácidos idêntica (Bach, Lan *et al.*, 1988). A sequência de aminoácidos da MAO-A de humanos (Bach, Lan *et al.*, 1988; Hsu, Weyler *et al.*, 1998; Hubalek, Pohl *et al.*, 2003) e de ratos (Kuwahara, Takamoto *et al.*, 1990) é altamente conservada (>87% idênticas), assim como, a sequência de aminoácidos da MAO-B de humanos (Bach, Lan *et al.*, 1988; Hubalek, Pohl *et al.*, 2003) e de ratos (Ito, Kuwahara *et al.*, 1988) (88% idênticas).

A partir da obtenção de formas cristalizadas das isoformas da enzima (Abell e Kwan, 2001; Binda, Li *et al.*, 2003; Ma, Yoshimura *et al.*, 2004; De Colibus, Li *et al.*, 2005; Son, Ma *et al.*, 2008) foi possível estabelecer a estrutura tridimensional das isoformas da MAO de ratos e de humanos, bem como prever resíduos importantes para a formação do sítio ativo e os responsáveis pela especificidade à substratos e inibidores.

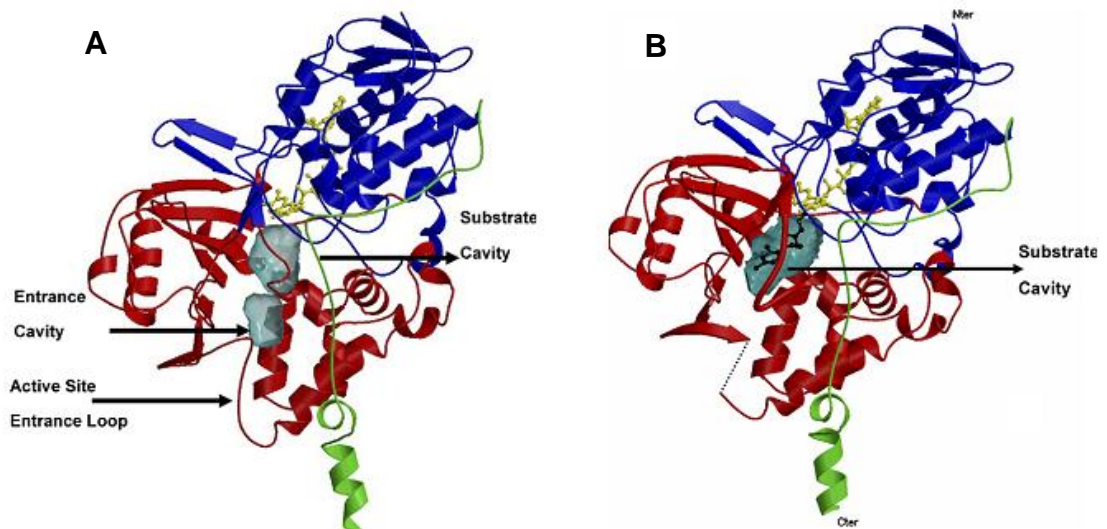


Figura 7 - Estrutura da MAO-A (A) e da MAO-B (B) humanas.

Fonte: Adaptado de (Edmondson, Binda *et al.*, 2007).

Na figura 7, podemos observar que a MAO-B humana possui três domínios bem definidos: o domínio do substrato (vermelho), o domínio flavina (azul) com o grupamento flavina em amarelo representando o domínio de ligação dos inibidores clássicos, e o domínio de membrana (verde) (Edmondson, Binda *et al.*, 2007). O grupamento flavina apresenta-se covalentemente ligado a um resíduo de cisteína 406 no caso da MAO-A, ou 397 no caso da MAO-B. Além disso, as porções C-terminais são alfa-hélices transmembranas que ancoram a enzima na membrana externa da mitocôndria, com o restante da proteína exposta ao citosol. A entrada do substrato ou inibidor no sítio ativo ocorre perto da intersecção da enzima com a superfície de membrana mitocondrial (Youdim e Bakhle, 2006b). Mesmo que a sequência de aminoácidos da MAO humana e da MAO de rato sejam muito similares, suas diferenças em relação às formas e dimensões das cavidades dos sítios de ligação a substrato/inibidor podem afetar as interações com inibidores (De Colibus, Li *et al.*, 2005)

1.6.1 Seletividade de Substratos

Estudar quais são as especificidades na seleção de substratos e no reconhecimento de inibidores para cada isoforma da MAO é essencial para entender os sistemas biológicos associados a essas enzimas e também para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos. As enzimas MAO A e B foram originalmente distinguidas pela diferença de seletividade entre os seus inibidores acetilênicos clorgilina e selegilina (ou l-deprenil), e também distinguidas pela seletividade em relação aos substratos (Youdim, Edmondson *et al.*, 2006a).

A MAO-A catalisa, preferencialmente, a desaminação de serotonina e norepinefrina e é sensível a inibição irreversível do inibidor seletivo clorgilina (Fowler, 1982; Fowler e Oreland, 1982; Abell e Kwan, 2001). No cérebro, a MAO-A encontra-se, preferencialmente, em neurônios catecolaminérgicos, enquanto que periféricamente esta isoforma está presente no intestino, placenta, fígado, entre outros órgãos (Abell e Kwan, 2001). Quando o gene da MAO-A é deficiente, em humanos ou camundongos, observam-se altos níveis de serotonina e norepinefrina e o fenótipo é caracterizado por um aumento no comportamento agressivo. Além disso, inibidores da MAO-A já foram amplamente utilizados no tratamento da depressão, especialmente em paciente com depressão atípica ou resistente ao tratamento (Amrein, Hetzel *et al.*, 1993; Tiller, 1993; Amrein, Martin *et al.*, 1999). Atualmente, os inibidores da MAO foram substituídos por novos antidepressivos por causa dos possíveis efeitos colaterais graves,

A MAO-B oxida preferencialmente β -feniletilamina e benzilamina, sendo inibida irreversivelmente pelo inibidor seletivo selegilina (Knoll e Magyar, 1972). Ela é altamente expressa em células gliais e em neurônios serotoninérgicos, embora não esteja envolvida diretamente na desaminação da serotonina. Acredita-se que a expressão da MAO-B acompanha o aumento de astrócitos, que ocorre, normalmente, durante o envelhecimento. A deficiência no gene da MAO-B em camundongos resulta em um aumento nos níveis de β -feniletilamina, norepinefrina e dopamina, mas não nos níveis de serotonina. Além disso, a MAO-B participa na biotransformação de neurotoxinas como a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) que é convertida em 1-metil-4-fenilpirinium (MPP+), uma neurotoxina que mimetiza a doença de Parkinson em modelos animais (Chiba, Trevor *et al.*, 1984;

Fritz, Abell *et al.*, 1985). Estudos mostram que a inibição seletiva desta isoforma pode conferir neuroproteção por aumentar os níveis de dopamina no estriado e também por causar efeitos antioxidantes através da redução da formação de H_2O_2 . Dessa forma justifica-se a utilização destes inibidores como adjuvantes no tratamento da doença de Parkinson ou em pacientes com sintomas pré-Parkinson (Cesura e Pletscher, 1992; Youdim, Edmondson *et al.*, 2006a).

1.7 Monoamina oxidase B e Doença de Alzheimer

O estudo da MAO foi impulsionado pela descoberta de que sua inibição auxilia nos tratamentos de distúrbios neurológicos. Durante o envelhecimento, como citado anteriormente, os níveis de MAO-B aumentam, devido à proliferação das células gliais e um dos problemas acarretados por isso é que a reação catalisada pela MAO B produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podendo danificar tecidos nervosos por meio de estresse oxidativo. Estudos mostram que altos níveis de MAO B induzem apoptose nos neurônios e nas células dos rins (Vindis, Seguelas *et al.*, 2000).

Podemos perceber que a MAO B está claramente envolvida em uma variedade de doenças que afetam, em particular, as pessoas idosas. Elevados níveis de MAO B também são encontrados nos astrócitos do cérebro de pacientes com DA (Saura, Luque *et al.*, 1994). Tem-se relatado que em pacientes com DA ocorre um aumento na atividade da enzima MAO-B (Jossan, Gillberg *et al.*, 1991; Sparks, Woeltz *et al.*, 1991; Saura, Luque *et al.*, 1994) e que esse aumento na atividade enzimática pode estar relacionada com a progressão da DA (Emilsson, Saetre *et al.*, 2002).

1.8 Inibidores da MAO

Os inibidores da MAO da primeira e da segunda geração são inibidores enzimáticos irreversíveis. Estas substâncias ligam-se a MAO formando uma ligação covalente com o sítio ativo da enzima, destruindo definitivamente a função desta

enzima (Kearney, Salach *et al.*, 1971; Bach, Lan *et al.*, 1988). A atividade enzimática somente será restabelecida após a síntese de novas moléculas de MAO, pois uma vez a enzima ligando-se ao inibidor, este não mais exercerá sua função até que nova molécula de enzima seja sintetizada pelo núcleo da célula (Finberg, Sabbagh *et al.*, 1980; Kyburz, 1990). Além disso, estes inibidores da MAO tendem a perder a seletividade inicial com doses maiores ou com administrações repetidas. Dessa maneira, as ações produzidas pelo uso destes compostos podem ter limitações importantes para a utilização na clínica, como efeitos nervosos centrais (insônia, irritabilidade, agitação, hipomania, supressão do sono REM), disfunções cardiovasculares (hipotensão ortostática), reações hipertensivas graves e distúrbios sexuais (Cesura e Pletscher, 1992; Strolin-Benedtti e Dostert, 1992).

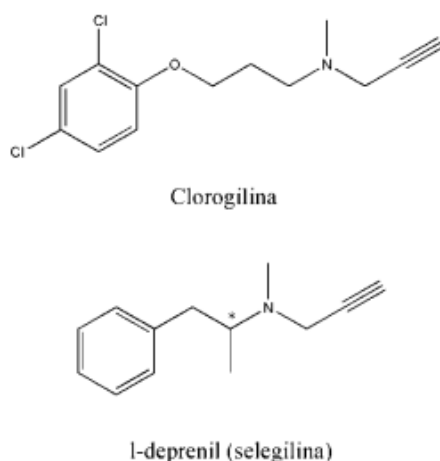


Figura 8 - Estruturas da clorgilina e selegilina.
Fonte: (Lu, Zhou *et al.*, 2013).

A segunda geração de inibidores da MAO engloba a clorgilina e a selegilina, inibidores seletivos da MAO-A (Johnston, 1968) e da MAO-B (Knoll, Ecseri *et al.*, 1965), respectivamente. Estes inibidores possuem um papel importante em estudos relacionados à inibição da MAO. A clorgilina foi bastante utilizada como antidepressivo e ansiolítico (Zisook, 1985) e a selegilina ainda é amplamente estudada e utilizada como adjuvante no tratamento da doença de Parkinson, em combinação com a L-DOPA (Tetrud e Langston, 1989; Waters, Sethi *et al.*, 2004; Ondo, 2006). Diferentemente dos inibidores não-seletivos da MAO, os inibidores

seletivos de MAO-B não apresentam efeitos colaterais como a reação do queijo, em razão do intestino conter pouco MAO-B e a tiramina ser efetivamente metabolizada pela MAO-A intestinal. No entanto a selegilina, que é um análogo estrutural da anfetamina, é metabolizada *in vivo* em L-anfetamina e L-metanfetamina (Reynolds, Riederer *et al.*, 1978), metabólitos potencialmente tóxicos, possuindo ações simpatomiméticas semelhantes a anfetamina (Simpson, 1978; Finberg, Tenne *et al.*, 1981).

Os inibidores da MAO-B são alvos de muitas pesquisas para o tratamento de doenças como Parkinson e Alzheimer. Isto é devido a MAO-B, primeiramente, corresponder a 80% da atividade da MAO total em cérebro de humanos. Ainda, a MAO-B é a principal responsável pela degradação da β -feniletilamina, uma amina endógena que estimula a liberação de dopamina e inibe sua recaptação. Assim, a inibição da MAO-B proporciona um aumento nos níveis de dopamina, melhorando a transmissão dopaminérgica, tão prejudicada na doença e Parkinson (Chen e Swope, 2005).

As associações de selegilina e de donepezil (Tsunekawa, Noda *et al.*, 2008) ou selegilina e vitamina E (Sano, Ernesto *et al.*, 1997) também mostram certos benefícios na cognição em camundongos e pacientes com DA. Apesar de muitos estudos apontarem inibidores da MAO-B como prováveis fármacos para o tratamento da DA, ainda não há dados suficientes que comprovam a reversão do déficit cognitivo de pacientes com DA.

Apesar dos avanços científicos significativos para delinear os fatores celulares e moleculares que contribuem para a etiologia da DA, há poucas abordagens satisfatórias para melhorar os sintomas ou retardar o curso degenerativo desta doença. Atualmente poucos fármacos são aprovados para o tratamento da disfunção cognitiva da DA, sendo que essas drogas podem compensar apenas uma parte da disfunção neuronal dessa doença. Assim, é de extrema importância o estudo de novos fármacos, como a selegilina que já é estabelecida no mercado, a fim de termos um maior número de recursos terapêuticos para tratar a DA. Portanto, este trabalho visa investigar o papel da MAO-B, utilizando como ferramenta de estudo a selegilina, um inibidor seletivo da MAO-B, em um modelo experimental de DA em camundongos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o papel da MAO-B no déficit cognitivo induzido por um modelo experimental de DA em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se o tratamento com o inibidor seletivo da MAO-B, selegilina, reduz o déficit cognitivo causado pela injeção intracerebroventricular (icv) de peptídeo β amilóide em camundongos através da tarefa de reconhecimento de objetos;

- Verificar se existe alteração na atividade enzimática da MAO-A e MAO-B em diferentes regiões cerebrais (córtex cerebral total, córtex perirrinal e hipocampo) em camundongos tratados com peptídeo β amilóide e/ou selegilina.

3 MANUSCRITO

3 MANUSCRITO

Selegiline Reverses A β ₂₅₋₃₅-Induced Cognitive Deficit in Mice

Andréia M Pazini^a, Jardel G Villarinho^a, Guilherme M Gomes^b,
Claudio da Cunha^c, Francielle Pinheiro^a, Ana Paula O Ferreira^b, Carlos F Mello^a,
Juliano Ferreira^{a,b,1}, Maribel A Rubin^{a,b,1,*}

^aPrograma de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^cDepartamento de Farmacologia, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.

*Corresponding author: (Maribel Antonello Rubin) Programa de Pós-graduação em Farmacologia, CCS, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Cidade Universitária, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

e-mail: maribel.rubin@gmail.com

¹ These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is biochemically characterized by the occurrence of extracellular deposits of amyloid beta peptide ($A\beta$) and intracellular deposits of the hyperphosphorylated tau protein, which are causally related to the pathological hallmarks senile plaques and neurofibrillary tangles. Monoamine oxidase B (MAO-B) activity, an enzyme involved in the oxidation of biogenic monoamines, is particularly high around the senile plaques and increased in AD patients in middle to late clinical stages of the disease. Selegiline, a selective and irreversible MAO-B inhibitor, improves learning and memory in AD patients. Notwithstanding, its mechanism of action is still not completely known. The current study aimed to investigate whether selegiline improves the $A\beta_{25-35}$ -induced cognitive deficit in the object recognition task in mice. In addition, we investigated whether selegiline alters MAO-B and MAO-A activities in the hippocampus, perirhinal and remaining cerebral cortices of $A\beta_{25-35}$ -injected mice. Acute (1 and 10 mg/kg, p.o., immediately post-training) and subchronic (10 mg/kg, p.o., seven days after $A\beta_{25-35}$ injection and immediately post-training) administration of selegiline reversed the cognitive impairment induced by $A\beta_{25-35}$ (3 nmol, i.c.v.). Acute administration of selegiline (1 mg/kg, p.o.) in combination with $A\beta_{25-35}$ (3 nmol) decreased MAO-B activity in the perirhinal and remaining cerebral cortices. Acute administration of selegiline (10 mg/kg, p.o.) decreased MAO-B activity in hippocampus, perirhinal and remaining cerebral cortices, regardless of $A\beta_{25-35}$ or $A\beta_{35-25}$ treatment. MAO-A activity was not altered by selegiline or $A\beta_{25-35}$. In summary, the current findings further support a role for MAO-B in the cognitive deficits observed in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, MAO inhibitors, MAO-B, perirhinal cortex, memory, object recognition.

1 Introduction

It has been estimated that nearly 36 million people lived with AD and other dementias worldwide in 2010, and that this number may increase to 66 million in 2030 and 115 million in 2050. (Prince, Bryce *et al.*, 2013). Considering the increase in the number of cases of dementia and other costs, expenditure on long-term care services for older people with dementia in England is projected to rise from 0.60% (in 202) to 0.99% of gross domestic product in 2031 (around £17.1 billion) (Comas-Herrera, Northey *et al.*, 2011). These data, combined with the current view that the available therapy (including pharmacological) causes, at best, partial and temporary relief of cognitive deficit (Desai e Grossberg, 2005; Doody, 2005) and does not alter the progress of the disease (Fan e Chiu, 2010), has boosted preclinical studies in the field. In this context it has been reported that selegiline, a MAO-B inhibitor, improves $A\beta_{25-35}$ -induced cognitive impairment in the Y-maze and conditioned fear learning tasks in mice (Tsunekawa, Noda *et al.*, 2008). Moreover, the co-administration of selegiline and donepezil significantly ameliorates scopolamine plus p-chlorophenylalanine-induced memory deficits in the Morris water maze (Takahata, Minami *et al.*, 2005). Accordingly, chronic administration of selegiline (for 21 days) improves the memory of aged male Wistar rats in the object recognition task (De Lima, Laranja *et al.*, 2005).

Patients in the middle to late clinical stages of AD present increased monoamine oxidase B (MAO-B) activity (Sparks, Woeltz *et al.*, 1991; Saura, Luque *et al.*, 1994). This enzyme is responsible for the catabolism of biogenic amines, such as dopamine, benzylamine and phenylethylamine (Youdim, Edmondson *et al.*, 2006a). Moreover, decreased levels of dopamine and norepinephrine were found in the brain of AD patients, when compared with age-matched controls (Reinikainen, Soininen *et al.*, 1990). In line with this view, inhibition of MAO-B and MAO-A activities increases the levels of these monoamines (Youdim, Edmondson *et al.*, 2006a).

Although the selective and irreversible MAO-B inhibitor selegiline has been employed to slow down the progression of the Parkinson's disease (Jenner, 2004; Waters, Sethi *et al.*, 2004; Pahwa, Factor *et al.*, 2006), it has also been used for the treatment of AD (Sano, Ernesto *et al.*, 1997; Thomas, 2000; Wilcock, Birks *et al.*, 2002). The inhibition of MAO-B activity, with consequent increases of dopaminergic activity, is often considered to be the neurochemical mechanism involved in the

improvement of cognitive performance caused by selegiline in aged rats (Brandeis, Sapir *et al.*, 1991) and individuals affected by AD (Tariot, Cohen *et al.*, 1987).

Since pre-clinical studies might contribute to the understanding of cognitive dysfunction related to neurodegenerative disorders, the present study aimed to investigate whether selegiline improves cognitive impairment exhibited by A β ₂₅₋₃₅-injected animal model of AD. In addition we investigated whether selegiline and A β ₂₅₋₃₅ alter MAO-A and MAO-B activity in hippocampus, perirhinal and remaining cerebral cortices of mice.

2 Materials and methods

2.1 Animals

The experiments were conducted using male Swiss mice (30-35 g). The animals had free access to water and food (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil), and were maintained in a humidity and temperature-controlled room (22 \pm 2 °C) under a 12-h light-dark cycle. Behavioral experiments were conducted in a sound-attenuated and air-regulated room, where the animals were habituated 1 hour prior to experiments. Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (between 9:00 A.M. and 5:00 P.M.) using independent experimental groups of mice. All animal experimentation reported in this study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process number 67/2011) and conducted in accordance with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995. All experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering.

2.2 Drugs and treatment procedures

A β ₃₅₋₂₅, A β ₂₅₋₃₅, selegiline hydrochloride, clorgyline hydrochloride and kynuramine dihydrobromide were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Selegiline hydrochloride was dissolved in saline (0.9% NaCl) for *in vivo* experiments.

For *ex vivo* experiments clorgyline hydrochloride, kynuramine dihydrobromide and selegiline hydrochloride were dissolved in assay buffer (16.8 mM Na₂HPO₄, 10.6 mM KH₂PO₄, 3.6 mM KCl, pH 7.4). All the other reagents used were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

A β ₂₅₋₃₅, and A β ₃₅₋₂₅ (inverted sequence used as control), were dissolved in 50 mM phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4) at a concentration of 3 mM and stored at -20°C. A β aggregation was performed according to Maurice and coworkers (1996), where 3 mM of A β ₃₅₋₂₅ and A β ₂₅₋₃₅ peptide were incubated at 37°C for 4 days. Mice received intracerebroventricularly (i.c.v.) administration of A β ₃₅₋₂₅ or A β ₂₅₋₃₅ and orally (10 mL/kg, p.o., by gavage) vehicle or selegiline.

2.3 A β ₂₅₋₃₅ -injected mouse model

Intracerebroventricular injections of A β ₂₅₋₃₅ and, A β ₃₅₋₂₅ (3 nmol/3.2 μ L) were performed as described previously (Haley e McCormick, 1957). Briefly, mice were anesthetized with isofluorane and the needle was inserted unilaterally 1 mm to the right of the midline point equidistant from each eye, at an equal distance between the eyes and the ears and perpendicular to the plane of the skull. The microinjections were performed using a Hamilton syringe connected to a 28-gauge stainless-steel needle with 3 mm in length.

2.4 Object recognition task

The object recognition task was performed in a 30 x 30 x 30 cm wooden chamber, with walls painted black and the front wall made of Plexiglas and the floor covered with ethyl vinyl acetate sheet. A light bulb, hanging 60 cm above the behavioral apparatus, provided constant illumination of about 40 lux, and an air-conditioner provided constant background sound isolation. The objects used were plastic mounting bricks, each of them with different shapes and colors, but same size. Throughout the experiments objects were used in a counterbalanced manner

and animals did not previously display preference for any of the objects. Chambers and objects were cleaned before each experiment with 30% ethanol.

Six days after A β peptide injection, the object recognition task was performed (Wang, Noda *et al.*, 2007). The task consisted of habituation, training and testing sessions, each of them with the duration of 10 minutes. In the first session, mice were habituated to the behavioral apparatus and then returned to its home cage. Twenty-four hours later, training session took place, where animals were exposed to 2 equal objects (object A), and the exploration time was recorded with two stopwatches. Exploration was recorded when the animal touched or reached the object with the nose at a distance of less than 2 cm. Climbing or sitting in the object was not consider exploration. The test session was carried out 24 hours after training. Mice was placed back in the behavioral chamber and one of the familiar objects (i.e. object A) was replaced by a novel object (i.e. object B). The time spent exploring the familiar and the novel objects were recorded. The discrimination index was then calculated, taking into account the difference of time spent exploring the novel (B) and the familiar (A) object x 100 divided by the sum of time spent exploring the novel (B) and the familiar (A), and used as a cognitive parameter ($[(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}}) / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})] \times 100$).

Saline or selegiline were administered acutely immediately after training of object recognition task, or subchronically (once a day for 7 days) with the last dose administered immediately after object recognition task training session. Therefore, we conducted two experimental treatments: acute (saline or selegiline 1 or 10 mg/kg) and subchronic (saline or selegiline 10 mg/kg). The doses of selegiline were chosen based on a pilot experiment.

2.5 Monoamine oxidase assay

Immediately after the training session of the object recognition task, one group of animals received saline (0.9% NaCl, 10 ml/kg, p.o.) or selegiline (1 or 10 mg/kg, p.o.) immediately after training. One hour after drug administration the animals were killed and the hippocampi, perirhinal and remaining cerebral cortices (cerebral cortex without the perirhinal cortex) were dissected and homogenized in assay buffer (16.8

mM Na₂HPO₄, 10.6 mM KH₂PO₄, 3.6 mM KCl, pH 7.4). MAO-A and MAO-B activities were measured by detecting the formation of the fluorescent product 4-hydroxyquinoline (4-HQ) using kynuramine as substrate, as previously described (Matsumoto, Suzuki *et al.*, 1985; Sant' Anna Gda, Machado *et al.*, 2009; Villarinho, Oliveira *et al.*, 2012). Briefly, assays were performed in duplicate in a final volume of 500 µL containing 0.25 mg of protein and incubated at 37°C for 30 min. MAO-A and MAO-B activities were isolated pharmacologically by incorporating 250 nM selegiline (selective MAO-B inhibitor) or 250 nM clorgyline (selective MAO-A inhibitor) into the reaction mixture. The reaction mixture was pre-incubated at 37 °C for 5 min and the reaction was started by the addition of 60 µM kynuramine. Results were expressed as nmol of 4-HQ /mg of protein/min.

2.6 Statistical analysis

Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test, when appropriate, presented as mean ± S.E.M. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Effects of selegiline on Aβ₂₅₋₃₅-induced cognitive impairment

We found no significant difference in the amount of time that animals of all groups spent exploring both objects in the training session, indicating no biased exploration of the objects (data not shown). However, during the test session, Aβ₂₅₋₃₅-injected mice performed worse than controls in the object recognition task, as shown by a decrease in the discrimination index when compared with control ($p < 0.05$, Fig. 1 and 2). The subchronic administration of selegiline (10 mg/kg, p.o., once a day for seven days after Aβ₂₅₋₃₅ injection and immediately post-training) significantly reversed the decrease of discrimination index induced by Aβ₂₅₋₃₅ ($p < 0.05$, Fig. 1). The acute administration of selegiline (1 and 10 mg/kg, p.o., immediately post-training) significantly reversed the decrease of discrimination index induced by Aβ₂₅₋₃₅

($p < 0.05$, Fig. 2A and 2B). These results indicate that acute and subchronic oral administration of selective and irreversible MAO-B inhibitor reversed the impairment of cognition induced by $A\beta_{25-35}$ peptide in the object recognition task.

3.2 Effects of selegiline on MAO activity *ex vivo*

Figures 3 and 4, show that i.c.v. injection of $A\beta_{25-35}$ peptide (3 nmol) did not alter MAO-B and MAO-A activities of saline treated mice in any brain structure examined compared with $A\beta_{35-25}$ control mice.

Acute administration of selegiline (1 mg/kg, p.o.) in combination with $A\beta_{25-35}$ (3 nmol, i.c.v.) decreased MAO-B activity in the perirhinal cortex ($p < 0.05$, Fig. 3E) but not in hippocampus ($p > 0.05$, Fig. 3A). The same treatment decreased the MAO-B activity in cerebral cortex of both $A\beta_{25-35}$ and $A\beta_{35-25}$ treated mice ($p < 0.05$, Fig. 3C). Moreover, as expected, the acute administration of selegiline (1 mg/kg, p.o.) did not alter MAO-A activity in any brain regions analyzed in both $A\beta_{25-35}$ or $A\beta_{35-25}$ treated mice ($p > 0.05$, Fig. 3B, D, F).

Acute administration of selegiline (10 mg/kg, p.o) caused a pronounced inhibition of the MAO-B activity in hippocampus ($p < 0.01$, Fig. 4A), cerebral cortex ($p < 0.01$, Fig. 4C), and perirhinal cortex ($p < 0.01$, Fig. 4E) of both $A\beta_{25-35}$ and $A\beta_{35-25}$ treated mice. However, selegiline (10 mg/kg, p.o) or $A\beta_{25-35}$ did not alter the MAO-A activity in any brain structures studied ($p > 0.05$, Fig. 4B, D, F).

4 Discussion

The episodic memories are affected early in AD (Christensen, Kopelman *et al.*, 1998; Collie e Maruff, 2000; Bondi, Jak *et al.*, 2008) and this deficit of episodic memory can be assessed by the object recognition task (Christensen, Kopelman *et al.*, 1998). In this study we showed that i.c.v. injection of $A\beta_{25-35}$ peptide impaired cognition in the object recognition task. We also showed that acute or subchronic administration of selegiline (1 and 10 mg/kg) improved the cognition impairment induced by $A\beta_{25-35}$ peptide, but did not affect object recognition memory in $A\beta_{35-25}$ - injected mice.

Our results are consistent with those obtained by Tsunekawa and colleagues (2008), who have shown that acutely administered selegiline (3 mg/kg) improves the cognitive impairment induced by A β _{25–35} using the Y-maze and conditioned fear learning tasks in mice (Tsunekawa, Noda *et al.*, 2008). Our results are also in agreement with de Lima and colleagues (2005) who have shown that selegiline (1 mg/kg for 21 days) reverses the memory impairment of aged male Wistar rats, in the object recognition task (De Lima, Laranja *et al.*, 2005). Moreover, the co-administration of selegiline (1 or 2.5 mg/kg) and donepezil (0.3 or 3 mg/kg) significantly ameliorates scopolamine plus *p*-chlorophenylalanine-induced memory deficits of rats, in the Morris water maze (Takahata, Minami *et al.*, 2005). Accordingly, selegiline (10 mg/day, for 24 weeks) has a long-term beneficial effect on the memory of patients with criteria for mild to moderate AD (Filip e Kolibas, 1999).

Current evidence suggests that selegiline has neuroprotective and psychostimulant effects (Castells, Casas *et al.*, 2010). Moreover, MAO-B inhibition might lead to an increase in the availability of dopamine and norepinephrine in the synaptic cleft of selected cerebral structures. In this regard, the stimulation of beta-adrenergic and D1/D5 dopaminergic receptors by norepinephrine or dopamine might enhance memory consolidation through activation of the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in the hippocampus (Bevilaqua, Ardenghi *et al.*, 1997; Bach, Barad *et al.*, 1999). Furthermore, selegiline displays antioxidant activity, and increases nitric oxide (NO) production with consequent dilation of cerebral blood vessels (Zeng, Bongrani *et al.*, 1995; Thomas, Mclendon *et al.*, 1998; Magyar e Haberle, 1999; Thomas, 2000; Kiray, Uysal *et al.*, 2004). NO facilitates synaptic plasticity and memory formation in rats (Fin, Da Cunha *et al.*, 1995; Thomas, 2000; Liu, Smith *et al.*, 2004; Pitsikas, Rigamonti *et al.*, 2005). Therefore, it is possible that mechanisms other than facilitating monoaminergic transmission underlies the currently described facilitatory effect of selegiline on cognition, including increased blood perfusion of the brain with consequent improvement of the energetic status and activation of putative neuroprotective and trophic mechanisms, that facilitate synaptic plasticity.

Current evidence supports that intracerebroventricular injections of A β _{25–35} peptide induces the deposition and dissemination of A β in the cerebral cortex and hippocampus of mice, accompanied by both short and long-term memory deficits (Maurice, Lockhart *et al.*, 1996; Olariu, Tran *et al.*, 2001) and neuronal loss in the hippocampus (Maurice, Lockhart *et al.*, 1996; Meunier, Ieni *et al.*, 2006). Moreover,

A β_{25-35} induces a dysfunction of the cholinergic system, which seems to play a role in the cognitive deficits associated with aging and neurodegenerative diseases (Tran, Yamada *et al.*, 2001; Hiramatsu, Watanabe *et al.*, 2004). Accordingly, the addition of A β_{25-35} to neuronal cultures induces apoptosis (Suh, Jung *et al.*, 2008) and oxidative stress (Varadarajan, Kanski *et al.*, 2001)

In this study we also showed that acutely administered selegiline (1 mg/kg, p.o.) decreases MAO-B activity in the perirhinal and cerebral cortex of A β_{25-35} peptide-injected rats and that selegiline (10 mg/kg, p.o.) decreases MAO-B activity in hippocampus, cerebral cortex and perirhinal cortex regardless of A β_{25-35} treatment. In this context, it has been shown that neurofibrillary tangles, a major neuropathological finding in AD, initially appear in a subregion of the perirhinal cortex and in the entorhinal cortex, before spreading to the hippocampus (Braak e Braak, 1991; Delacourte, David *et al.*, 1999). These data suggest that the cerebral cortex (including the perirhinal area) of A β_{25-35} peptide-injected rats is more sensitive to the inhibitory effect of selegiline on MAO-B than the hippocampus. Since acutely administered selegiline (1 mg/kg) reversed the deleterious effect of A β_{25-35} on cognition and inhibited MAO-B activity only in the cerebral cortex, it is possible that these effects were due to MAO-B inhibition in the cerebral cortex. However, more studies are necessary to elucidate this point.

In summary, this study shows that acute and subchronic oral administration of selegiline reverses the impairment of memory induced by i.c.v. administration of A β_{25-35} peptide. This study also shows that selegiline (1 mg/kg) in combination with A β_{25-35} decreases MAO-B activity in the cerebral cortex and that selegiline (10 mg/kg) decreases MAO-B activity in hippocampus, perirhinal and remaining cerebral cortices. The fact that the perirhinal cortex is one of the first structures affected in AD supports the use of selegiline in the early stages of the disease.

5 Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES) (Brazil). The authors thank Dr. Sara Marchesan de Oliveira for a critical reading of the manuscript.

Conflict of interest The authors have declared that there is no conflict of interest.

6 References

1. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP (2013) The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* 9 (1):63-75 e62
2. Comas-Herrera A, Northey S, Wittenberg R, Knapp M, Bhattacharyya S, Burns A (2011) Future costs of dementia-related long-term care: exploring future scenarios. *Int Psychogeriatr* 23 (1):20-30
3. Desai AK, Grossberg GT (2005) Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* 64 (12 Suppl 3):S34-39
4. Doody RS (2005) Refining treatment guidelines in Alzheimer's disease. *Geriatrics Suppl*:14-20
5. Fan LY, Chiu MJ (2010) Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol Taiwan* 19 (4):228-245
6. Tsunekawa H, Noda Y, Mouri A, Yoneda F, Nabeshima T (2008) Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35). *Behav Brain Res* 190 (2):224-232
7. Takahata K, Minami A, Kusumoto H, Shimazu S, Yoneda F (2005) Effects of selegiline alone or with donepezil on memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 518 (2-3):140-144
8. de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schroder N (2005) Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol* 40 (6):506-511
9. Sparks DL, Woeltz VM, Markesbery WR (1991) Alterations in brain monoamine oxidase activity in aging, Alzheimer's disease, and Pick's disease. *Arch Neurol* 48 (7):718-721

10. Saura J, Luque JM, Cesura AM, Da Prada M, Chan-Palay V, Huber G, Loffler J, Richards JG (1994) Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience* 62 (1):15-30
11. Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF (2006a) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7 (4):295-309
12. Reinikainen KJ, Soininen H, Riekkinen PJ (1990) Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnostics and therapy. *J Neurosci Res* 27 (4):576-586
13. Jenner P (2004) Preclinical evidence for neuroprotection with monoamine oxidase-B inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 63 (7 Suppl 2):S13-22
14. Waters CH, Sethi KD, Hauser RA, Molho E, Bertoni JM (2004) Zydys selegiline reduces off time in Parkinson's disease patients with motor fluctuations: a 3-month, randomized, placebo-controlled study. *Mov Disord* 19 (4):426-432
15. Pahwa R, Factor SA, Lyons KE, Ondo WG, Gronseth G, Bronte-Stewart H, Hallett M, Miyasaki J, Stevens J, Weiner WJ (2006) Practice Parameter: treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 66 (7):983-995
16. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 336 (17):1216-1222
17. Thomas T (2000) Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21 (2):343-348

18. Wilcock GK, Birks J, Whitehead A, Evans SJ (2002) The effect of selegiline in the treatment of people with Alzheimer's disease: a meta-analysis of published trials. *Int J Geriatr Psychiatry* 17 (2):175-183
19. Brandeis R, Sapir M, Kapon Y, Borelli G, Cadel S, Valsecchi B (1991) Improvement of cognitive function by MAO-B inhibitor L-deprenyl in aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 39 (2):297-304
20. Tariot PN, Cohen RM, Sunderland T, Newhouse PA, Yount D, Mellow AM, Weingartner H, Mueller EA, Murphy DL (1987) L-deprenyl in Alzheimer's disease. Preliminary evidence for behavioral change with monoamine oxidase B inhibition. *Arch Gen Psychiatry* 44 (5):427-433
21. Haley TJ, McCormick WG (1957) Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 12 (1):12-15
22. Wang D, Noda Y, Zhou Y, Mouri A, Mizoguchi H, Nitta A, Chen W, Nabeshima T (2007) The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology* 32 (6):1261-1271
23. Matsumoto T, Suzuki O, Furuta T, Asai M, Kurokawa Y, Nimura Y, Katsumata Y, Takahashi I (1985) A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. *Clin Biochem* 18 (2):126-129
24. Sant' Anna Gda S, Machado P, Sauzem PD, Rosa FA, Rubin MA, Ferreira J, Bonacorso HG, Zanatta N, Martins MA (2009) Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19 (2):546-549
25. Villarinho JG, Oliveira SM, Silva CR, Cabreira TN, Ferreira J (2012) Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. *Eur J Pharmacol* 690 (1-3):107-114

26. Christensen H, Kopelman MD, Stanhope N, Lorentz L, Owen P (1998) Rates of forgetting in Alzheimer dementia. *Neuropsychologia* 36 (6):547-557
27. Collie A, Maruff P (2000) The neuropsychology of preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurosci Biobehav Rev* 24 (3):365-374
28. Bondi MW, Jak AJ, Delano-Wood L, Jacobson MW, Delis DC, Salmon DP (2008) Neuropsychological contributions to the early identification of Alzheimer's disease. *Neuropsychol Rev* 18 (1):73-90
29. Filip V, Kolibas E (1999) Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer Type Study Group. *J Psychiatry Neurosci* 24 (3):234-243
30. Castells X, Casas M, Perez-Mana C, Roncero C, Vidal X, Capella D (2010) Efficacy of psychostimulant drugs for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD007380
31. Bevilaqua L, Ardenghi P, Schroder N, Bromberg E, Schmitz PK, Schaeffer E, Quevedo J, Bianchin M, Walz R, Medina JH, Izquierdo I (1997) Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behav Pharmacol* 8 (4):331-338
32. Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER (1999) Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (9):5280-5285
33. Thomas T, McLendon C, Thomas G (1998) L-deprenyl: nitric oxide production and dilation of cerebral blood vessels. *Neuroreport* 9 (11):2595-2600
34. Zeng YC, Bongrani S, Bronzetti E, Cadel S, Ricci A, Valsecchi B, Amenta F (1995) Effect of long-term treatment with L-deprenyl on the age-dependent

microanatomical changes in the rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 79 (2-3):169-185

35. Magyar K, Haberle D (1999) Neuroprotective and neuronal rescue effects of selegiline: review. *Neurobiology (Bp)* 7 (2):175-190

36. Kiray M, Uysal N, Sonmez A, Acikgoz O, Gonenc S (2004) Positive effects of deprenyl and estradiol on spatial memory and oxidant stress in aged female rat brains. *Neurosci Lett* 354 (3):225-228

37. Fin C, da Cunha C, Bromberg E, Schmitz PK, Bianchin M, Medina JH, Izquierdo I (1995) Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol Learn Mem* 63 (2):113-115

38. Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK (2004) Potential involvement of NOS and arginase in age-related behavioural impairments. *Exp Gerontol* 39 (8):1207-1222

39. Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Sakellaridis N, Muller EE (2005) The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiol Aging* 26 (2):259-264

40. Olariu A, Tran MH, Yamada K, Mizuno M, Hefco V, Nabeshima T (2001) Memory deficits and increased emotionality induced by beta-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J Neural Transm* 108 (8-9):1065-1079

41. Maurice T, Lockhart BP, Privat A (1996) Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 706 (2):181-193

42. Meunier J, Ieni J, Maurice T (2006) The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma₁ receptor. *Br J Pharmacol* 149 (8):998-1012

43. Hiramatsu M, Watanabe M, Baba S, Kojima R, Nabeshima T (2004) Alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptor and prodynorphin mRNA expression after administration of (-)-nicotine and U-50,488H in beta-amyloid peptide (25-35)-treated mice. *Ann N Y Acad Sci* 1025:508-514
44. Tran MH, Yamada K, Olariu A, Mizuno M, Ren XH, Nabeshima T (2001) Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Faseb J* 15 (8):1407-1409
45. Suh EC, Jung YJ, Kim YA, Park EM, Lee KE (2008) A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotoxicology* 29 (4):691-699
46. Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA (2001) Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). *J Am Chem Soc* 123 (24):5625-5631
47. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82 (4):239-259
48. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, Ghzali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52 (6):1158-1165

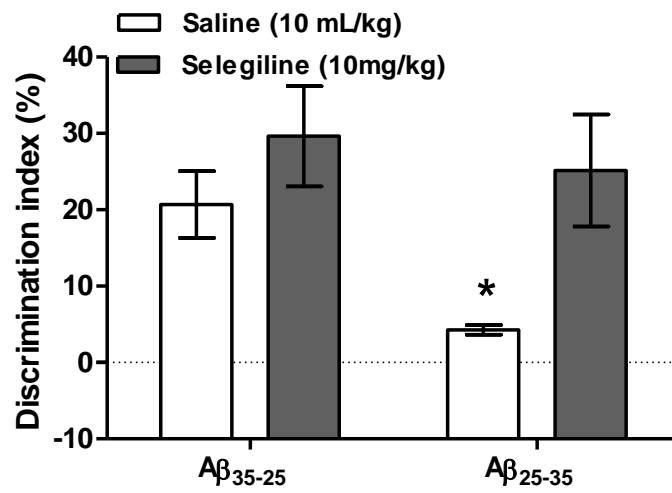


Fig. 1 Subchronic oral administration of selegiline (10 mg/kg, once a day for seven days after A β ₂₅₋₃₅ injection and immediately post-training) reverses the memory impairment induced by A β ₂₅₋₃₅ peptide (3 nmol, i.c.v.) on the discrimination index in the object recognition task in mice. A β ₃₅₋₂₅ and saline were used as vehicle. Data are the means + S.E.M. for 5-7 animals per group. * p <0.05 compared with saline-treated group.

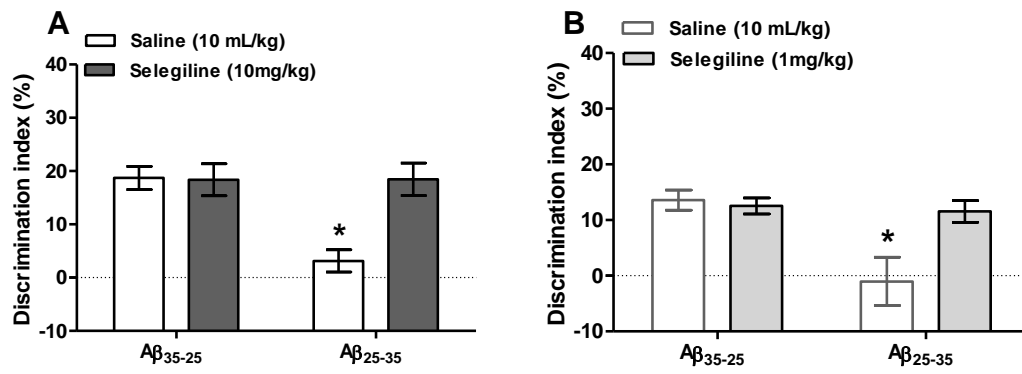


Fig. 2 Acute oral administration of selegiline [10 mg/kg (A) or 1 mg/kg (B), immediately post-training] reverse the memory impairment induced by Aβ₂₅₋₃₅ peptide (3 nmol, i.c.v.) on the discrimination index in the object recognition task in mice. Aβ₃₅₋₂₅ and saline were used as vehicle. Data are the means ± S.E.M. for 8-9 animals per group. **p*<0.05 compared with saline-treated group.

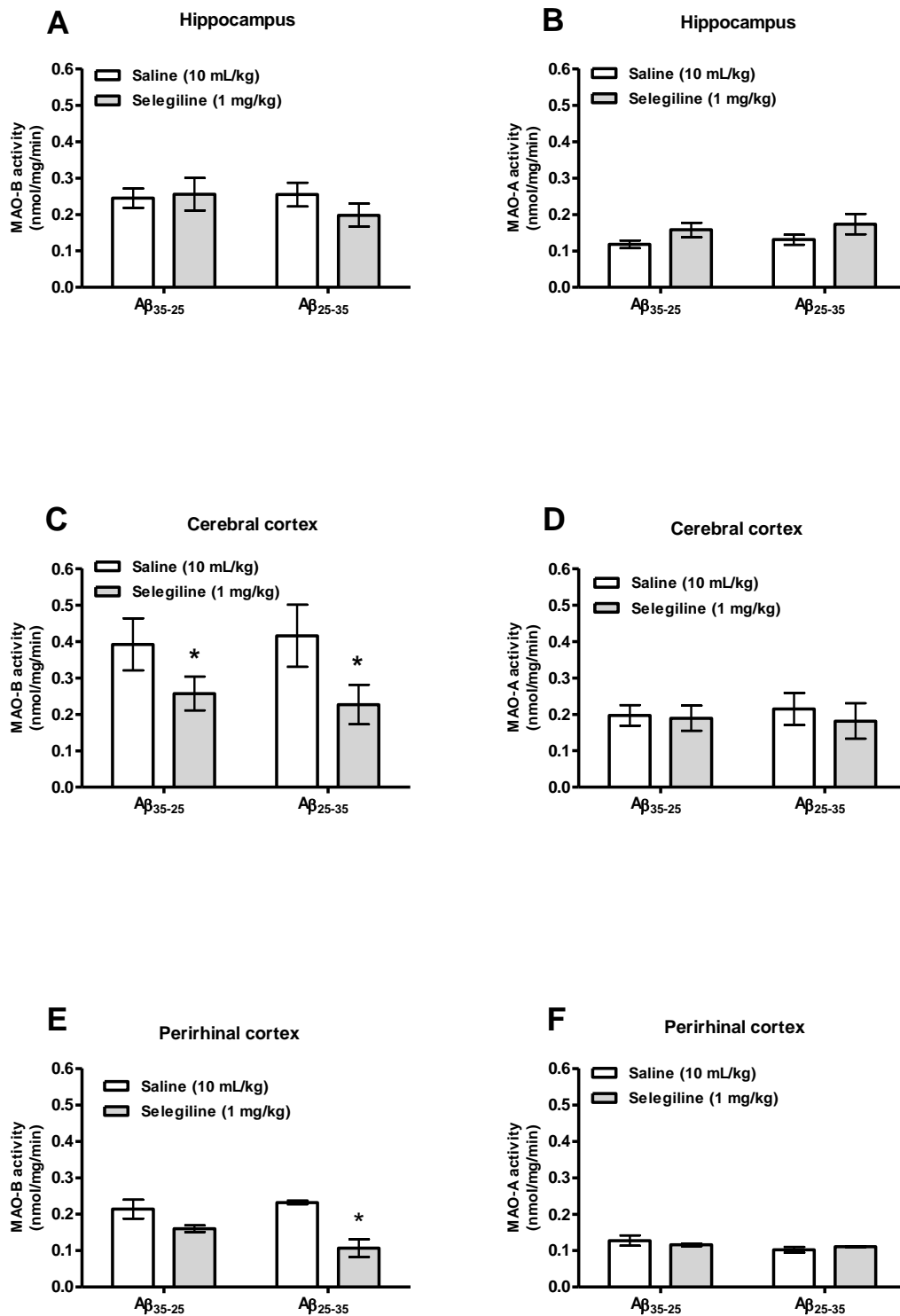


Fig. 3 Effect of acute administration of selegiline (1 mg/kg, p.o, immediately after training) and Aβ₂₅₋₃₅ peptide (3 nmol, i.c.v.) on monoamine oxidase (MAO) A and B activity in mice. MAO-B and MAO-A activities were determined in hippocampus (A and B), cerebral cortex (C and D) and perirhinal cortex (E and F), respectively. Aβ₃₅₋₂₅ and saline were used as vehicle. Data are the means ± S.E.M. of 8-9 animals per group. **p*<0.05 compared with saline-treated group.

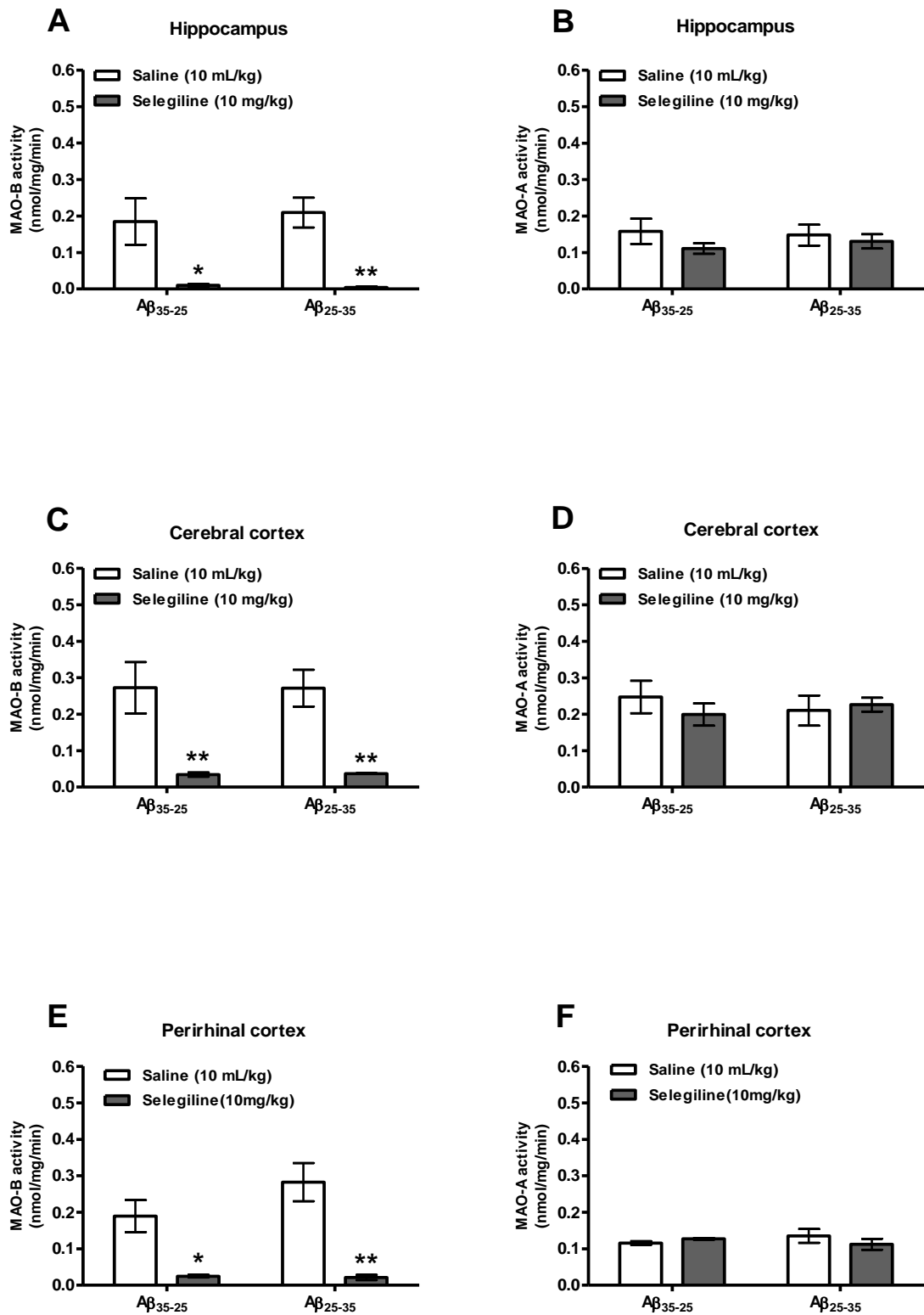


Fig. 4 Effect of acute administration of selegiline (10 mg/kg, p.o, immediately after training) and Aβ₂₅₋₃₅ peptide (3 nmol, i.c.v.) on monoamine oxidase (MAO) A and B activity in mice. MAO-B and MAO-A activities were determined in hippocampus (A and B), cerebral cortex (C and D) and perirhinal cortex (E and F), respectively. Aβ₃₅₋₂₅ and saline were used as vehicle. Data are the means ± S.E.M. of 8-9 animals per group. **p*<0.05 and ***p*<0.01 compared with respective saline-treated group.

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados do presente trabalho, podemos concluir que:

- O tratamento agudo e subcrônico com selegilina (1 e 10 mg/kg) reverteu o déficit cognitivo causado pelo peptídeo β amilóide em camundongos, sugerindo o envolvimento da MAO-B no prejuízo de memória induzido pelo peptídeo β amilóide;
- O tratamento agudo com selegilina 1 mg/kg nos animais tratados com o peptídeo β amilóide reduziu a atividade da MAO-B no córtex cerebral e perirrinal; O tratamento agudo com selegilina 10 mg/kg, por si só, e em combinação com o peptídeo β amilóide reduziu a atividade da MAO-B no hipocampo, no córtex cerebral total e no córtex perirrinal;
- O tratamento agudo com selegilina (1 e 10 mg/kg, p.o) e/ou com o peptídeo β amilóide não alteraram a atividade da MAO-A em todas as estruturas estudadas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abell, C. W. e S. W. Kwan. Molecular characterization of monoamine oxidases A and B. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, v.65, p.129-56. 2001.

Aggleton, J. P. e M. W. Brown. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. Behav Brain Sci, v.22, n.3, Jun, p.425-44; discussion 444-89. 1999.

Allegri, R. F., P. Harris, *et al.* Perfis Diferenciais de Perda de Memória entre a Demência Frontotemporal e a do Tipo Alzheimer. Psicologia: Reflexão e Crítica, n.14, p.317-324. 2001.

Amrein, R., W. Hetzel, *et al.* RIMA--a new concept in the treatment of depression with moclobemide. Int Clin Psychopharmacol, v.7, n.3-4, Jan, p.123-32. 1993.

Amrein, R., J. R. Martin, *et al.* Moclobemide in patients with dementia and depression. Adv Neurol, v.80, p.509-19. 1999.

Arriagada, P. V., J. H. Growdon, *et al.* Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. Neurology, v.42, n.3 Pt 1, Mar, p.631-9. 1992.

Ávila, C., M. Parcet, *et al.* Evaluación de la memoria mediante resonancia magnética funcional: aplicaciones en pacientes prequirúrgicos y en la enfermedad de Alzheimer. Revista de Neurología, v.38, p.284-291 2004.

Bach, A. W., N. C. Lan, *et al.* cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.13, Jul, p.4934-8. 1988.

Bach, M. E., M. Barad, *et al.* Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.9, Apr 27, p.5280-5. 1999.

Bahmanyar, S., G. A. Higgins, *et al.* Localization of amyloid beta protein messenger RNA in brains from patients with Alzheimer's disease. Science, v.237, n.4810, Jul 3, p.77-80. 1987.

Banati Rb, Gehrman J, *et al.* Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer beta A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia. Glia, v.9, n.3, Nov, p.199-210. 1993.

Barbeau, E., M. Didic, *et al.* Evaluation of visual recognition memory in MCI patients. Neurology, v.62, n.8, Apr 27, p.1317-22. 2004.

Bayles, K. A. A. K. Communication and cognition in normal aging and dementia. London. 1987

Bennett, D. A., J. A. Schneider, *et al.* Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions. Neurology, v.64, n.5, Mar 8, p.834-41. 2005.

Bevilaqua, L., P. Ardenghi, *et al.* Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. Behav Pharmacol, v.8, n.4, Aug, p.331-8. 1997.

Binda, C., M. Li, *et al.* Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.17, Aug 19, p.9750-5. 2003.

Bondi, M. W., A. J. Jak, *et al.* Neuropsychological contributions to the early identification of Alzheimer's disease. Neuropsychol Rev, v.18, n.1, Mar, p.73-90. 2008.

Bonini, J. S. Papel da proteína quinase C (PKC) no processamento de memórias aversivas e espaciais. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2006.

Braak, H. e E. Braak. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol, v.82, n.4, p.239-59. 1991.

_____. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. Neurobiol Aging, v.18, n.4, Jul-Aug, p.351-7. 1997.

Brandeis, R., M. Sapir, *et al.* Improvement of cognitive function by MAO-B inhibitor L-deprenyl in aged rats. Pharmacol Biochem Behav, v.39, n.2, Jun, p.297-304. 1991.

Busatto Filho, G. Fisiopatologia dos transtornos Psiquiátricos. SP: Atheneu. 2007

Busciglio, J., D. H. Gabuzda, *et al.* Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.5, Mar 1, p.2092-6. 1993.

Bussey, T. J. e J. P. Aggleton. The “what” and “where” of event memory: independence and interactivity within the medial temporal lobe. In: Parker, A., Wilding, E., Bussey, T.J. (Eds.). The Cognitive Neuroscience of Memory: Encoding and Retrieval. Psychology Press, London, p.217-233. 2002.

Campbell, H. Bioquímica. Porto Alegre. 2000

Caramelli, P. e M. T. Barbosa. Como diagnosticar as causas mais frequentes de demência? Revista Brasileira de Psiquiatria, v.24, n.Suplemento 1, p.7-10. 2002.

Castells, X., M. Casas, *et al.* Efficacy of psychostimulant drugs for cocaine dependence. Cochrane Database Syst Rev, n.2, p.CD007380. 2010.

Cesura, A. M. e A. Pletscher. The new generation of monoamine oxidase inhibitors. Prog Drug Res, v.38, p.171-297. 1992.

Charchat, H., R. Nitrini, *et al.* Investigação de Marcadores Clínicos dos Estágios Iniciais da Doença de Alzheimer com Testes Neuropsicológicos Computadorizados. Psicologia: Reflexão e Crítica, v.12, n.2, p.305-316. 2001.

Chen, J. J. e D. M. Swope. Clinical pharmacology of rasagiline: a novel, second-generation propargylamine for the treatment of Parkinson disease. J Clin Pharmacol, v.45, n.8, Aug, p.878-94. 2005.

Chiba, K., A. Trevor, *et al.* Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. Biochem Biophys Res Commun, v.120, n.2, Apr 30, p.574-8. 1984.

Christensen, H., M. D. Kopelman, *et al.* Rates of forgetting in Alzheimer dementia. Neuropsychologia, v.36, n.6, Jun, p.547-57. 1998.

Cohen, N. J. e L. R. Squire. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. Science, v.210, n.4466, Oct 10, p.207-10. 1980.

Collie, A. e P. Maruff. The neuropsychology of preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Neurosci Biobehav Rev, v.24, n.3, May, p.365-74. 2000.

Comas-Herrera, A., S. Northey, *et al.* Future costs of dementia-related long-term care: exploring future scenarios. Int Psychogeriatr, v.23, n.1, Feb, p.20-30. 2011.

Connors, B. W., M. F. Bear, *et al.* Desvendando o Sistema Nervoso.: Artmed. 2002. Artmed, p.

De Colibus, L., M. Li, *et al.* Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.36, Sep 6, p.12684-9. 2005.

De Felice, F. G. e S. T. Ferreira. Beta-amyloid production, aggregation, and clearance as targets for therapy in Alzheimer's disease. Cell Mol Neurobiol, v.22, n.5-6, Dec, p.545-63. 2002.

De Lima, M. N., D. C. Laranja, *et al.* Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. Exp Gerontol, v.40, n.6, Jun, p.506-11. 2005.

De Zutter, G. S. e R. J. Davis. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. Proc. Natl. Acad. Sci, v.USA 98, p.6168-6173. 2001.

Dekosky, S. T. [Neurobiology and molecular biology of Alzheimer's disease]. Rev Neurol, v.35, n.8, Oct 16-31, p.752-60. 2002.

Dekosky, S. T. e S. W. Scheff. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. Ann Neurol, v.27, n.5, May, p.457-64. 1990.

Delacourte, A., J. P. David, *et al.* The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. Neurology, v.52, n.6, Apr 12, p.1158-65. 1999.

Delacourte, A. e A. Defossez. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. J Neurol Sci, v.76, n.2-3, Dec, p.173-86. 1986.

Desai, A. K. e G. T. Grossberg. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. Neurology, v.64, n.12 Suppl 3, Jun 28, p.S34-9. 2005.

Donoso, A. S. La Enfermedad de Alzheimer. Revista Chilena de Neuropsiquiatria, n.41, p.13-22. 2003.

Donoso, A. S. e M. Behrens. Variabilidad y variantes de la enfermedad de Alzheimer. Revista Médica de Chile, n.33, p.477-482. 2005.

Doody, R. S. Refining treatment guidelines in Alzheimer's disease. Geriatrics, v.Suppl, Jun, p.14-20. 2005.

Eacott, M. J. e E. A. Gaffan. The roles of perirhinal cortex, postrhinal cortex, and the fornix in memory for objects, contexts, and events in the rat. Q J Exp Psychol B, v.58, n.3-4, Jul-Oct, p.202-17. 2005.

Edmondson, D. E., C. Binda, *et al.* Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. Arch Biochem Biophys, v.464, n.2, Aug 15, p.269-76. 2007.

Eichenbaum, H., A. P. Yonelinas, *et al.* The medial temporal lobe and recognition memory. Annu Rev Neurosci, v.30, p.123-52. 2007.

Emilsson, L., P. Saetre, *et al.* Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. Neurosci Lett, v.326, n.1, Jun 21, p.56-60. 2002.

Faber-Langendoen, K., J. C. Morris, *et al.* Aphasia in senile dementia of the Alzheimer type. Ann Neurol, v.23, n.4, Apr, p.365-70. 1988.

Fan, L. Y. e M. J. Chiu. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. Acta Neurol Taiwan, v.19, n.4, Dec, p.228-45. 2010.

Filip, V. e E. Kolibas. Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer Type Study Group. J Psychiatry Neurosci, v.24, n.3, May, p.234-43. 1999.

Fin, C., C. Da Cunha, *et al.* Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. Neurobiol Learn Mem, v.63, n.2, Mar, p.113-5. 1995.

Finberg, J. P., M. Tenne, *et al.* Tyramine antagonistic properties of AGN 1135, an irreversible inhibitor of monoamine oxidase type B. Br J Pharmacol, v.73, n.1, May, p.65-74. 1981.

Finberg, J. P. M., A. Sabbagh, *et al.* Pharmacology of selective propargyl "suicide" inhibitors of monoamine oxidase. Enzymes and Neurotransmitters in Mental Disease, p.107-119. 1980.

Forlenza, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. Rev. Psiq. Clín., v.32, p.137-148. 2005.

Fowler, C. J. Selective inhibitors of MAO types A and B and their clinical usefulness. Drugs Future, v.7, p.501-517. 1982.

Fowler, C. J. e L. Oreland. Human platelet MAO: some biochemical findings. Monamine Oxidase: Basic and Clinical Frontiers. Amsterdam, the Netherlands 1982. p.

Fritz, R. R., C. W. Abell, *et al.* Metabolism of the neurotoxin in MPTP by human liver monoamine oxidase B. FEBS Lett, v.186, n.2, Jul 8, p.224-8. 1985.

George-Carey, R., D. Adeloje, *et al.* An estimate of the prevalence of dementia in Africa: A systematic analysis. J Glob Health, v.2, n. An estimate of the prevalence of dementia in Africa: A systematic analysis.2, Dec, p.20401. 2012.

Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, *et al.* Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. Neurology, v.60, n.9, May 13, p.1495-500. 2003.

Greenfield, S. A. Cérebro Humano: Rocco. 2000

Grimsby, J., K. Chen, *et al.* Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.9, May 1, p.3637-41. 1991.

Haley, T. J. e W. G. McCormick. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. Br J Pharmacol Chemother, v.12, n.1, Mar, p.12-5. 1957.

Hamdan, A. C. e O. Bueno. Relações entre controle executivo e memória episódica verbal no comprometimento cognitivo leve e na demência tipo Alzheimer. Estudos de Psicologia, v.10, p.63-71. 2005.

Hardy, J. Alzheimer's Disease Research Group. . Molecular pathology of Alzheimer's disease. Lancet, v.1, p.1342-1343. 1991.

Hardy, J. e D. J. Selkoe. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, v.297, n.5580, Jul 19, p.353-6. 2002.

Hasegawa, M., M. Morishima-Kawashima, *et al.* Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. J Biol Chem, v.267, n.24, Aug 25, p.17047-54. 1992.

Hiramatsu, M., M. Watanabe, *et al.* Alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptor and prodynorphin mRNA expression after administration of (-)-nicotine and U-50,488H in beta-amyloid peptide (25-35)-treated mice. Ann N Y Acad Sci, v.1025, Oct, p.508-14. 2004.

Hodges, J. R. e K. Patterson. Is semantic memory consistently impaired early in the course of Alzheimer's disease? Neuroanatomical and diagnostic implications. Neuropsychologia, v.33, n.4, Apr, p.441-59. 1995.

Hsu, Y. P., W. Weyler, *et al.* Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences. J. neurochem, v.51, p.1321-24. 1998.

Hubalek, F., J. Pohl, *et al.* Structural comparison of human monoamine oxidases A and B: mass spectrometry monitoring of cysteine reactivities. J Biol Chem, v.278, n.31, Aug 1, p.28612-8. 2003.

Hyman, B. T., G. W. Van Hoesen, *et al.* Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. Ann Neurol, v.20, n.4, Oct, p.472-81. 1986.

Ingelsson, M., H. Fukumoto, *et al.* Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. Neurology, v.62, n.6, Mar 23, p.925-31. 2004.

Ito, A., T. Kuwahara, *et al.* Molecular cloning of a cDNA for rat liver monoamine oxidase B. Biochem Biophys Res Commun, v.157, n.3, Dec 30, p.970-6. 1988.

Izquierdo, I. Memória. Artmed, Porto Alegre. 2002

Jellinger, K. A. Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. J Neural Transm, v.113, n.11, Nov, p.1603-23. 2006.

Jenner, P. Preclinical evidence for neuroprotection with monoamine oxidase-B inhibitors in Parkinson's disease. Neurology, v.63, n.7 Suppl 2, Oct 12, p.S13-22. 2004.

Johnston, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. Biochem Pharmacol, v.17, n.7, Jul, p.1285-97. 1968.

Jossan, S. S., P. G. Gillberg, *et al.* Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: a biochemical and autoradiographical study. Neuroscience, v.45, n.1, p.1-12. 1991.

Kaleche, A. e R. R. Veras, L. O envelhecimento da população mundial: Um desafio novo. Revista de Saúde Pública, v.21, p.200-210. 1987.

Kanazawa, I. Short review on monoamine oxidase and its inhibitors. Eur Neurol, v.34 Suppl 3, p.36-9. 1994.

Kar, S., S. P. Slowikowski, *et al.* Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. J Psychiatry Neurosci, v.29, n.6, Nov, p.427-41. 2004.

Kearney, E. B., J. I. Salach, *et al.* The covalently-bound flavin of hepatic monoamine oxidase. 1. Isolation and sequence of a flavin peptide and evidence for binding at the 8alpha position. Eur J Biochem, v.24, n.2, Dec, p.321-7. 1971.

Kiray, M., N. Uysal, *et al.* Positive effects of deprenyl and estradiol on spatial memory and oxidant stress in aged female rat brains. Neurosci Lett, v.354, n.3, Jan 16, p.225-8. 2004.

Klucken, J., P. J. Mclean, *et al.* Neuritic alterations and neural system dysfunction in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. Neurochem Res, v.28, n.11, Nov, p.1683-91. 2003.

Knoll, J., Z. Ecseri, *et al.* Phenylisopropylmethylpropinylamine (E-250), a new spectrum psychic energizer. Arch Int Pharmacodyn Ther, v.155, n.1, May, p.154-64. 1965.

Knoll, J. e K. Magyar. Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. Adv Biochem Psychopharmacol, v.5, p.393-408. 1972.

Kuwahara, T., S. Takamoto, *et al.* Primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues. Agric Biol Chem, v.54, n.1, Jan, p.253-7. 1990.

Kyburz, E. New developments in the field of MAO inhibitors. Drugs News Perspect., v.3, p.592-599. 1990.

Lacor, P. N., M. C. Buniel, *et al.* Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. J Neurosci, v.24, n.45, Nov 10, p.10191-200. 2004.

Leblanc, A. C., R. Xue, *et al.* Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. J Neurochem, v.66, n.6, Jun, p.2300-10. 1996.

Lehninger, A. L. Princípios de Bioquímica. Sarvier: São Paulo. 2002

Lewis, D. A., G. A. Higgins, *et al.* Distribution of precursor amyloid-beta-protein messenger RNA in human cerebral cortex: relationship to neurofibrillary tangles and neuritic plaques. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.5, Mar, p.1691-5. 1988.

Liu, P., P. F. Smith, *et al.* Potential involvement of NOS and arginase in age-related behavioural impairments. Exp Gerontol, v.39, n.8, Aug, p.1207-22. 2004.

Lopera, F. Anamnesis en el estudio del paciente con demencia. Rev. Neurol., v.32, n.12, p.1187-1191. 2001.

Lu, C., Q. Zhou, *et al.* A novel series of tacrine-selegiline hybrids with cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities for the treatment of Alzheimer's disease. Eur J Med Chem, v.62C, Feb 8, p.745-753. 2013.

Lue, L. F., Y. M. Kuo, *et al.* Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. Am J Pathol, v.155, n.3, Sep, p.853-62. 1999.

Ma, J., M. Yoshimura, *et al.* Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. J Mol Biol, v.338, n.1, Apr 16, p.103-14. 2004.

Magyar, K. e D. Haberle. Neuroprotective and neuronal rescue effects of selegiline: review. Neurobiology (Bp), v.7, n.2, p.175-90. 1999.

Martinez-Lage, J. La enfermedad de Alzheimer en 1998. Revista de Neurología Suplemento, v.27, p.1-4. 1998.

Matsumoto, T., O. Suzuki, *et al.* A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. Clin Biochem, v.18, n.2, Apr, p.126-9. 1985.

Maurice, T., B. P. Lockhart, *et al.* Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. Brain Res, v.706, n.2, Jan 15, p.181-93. 1996.

Mcgaugh, J. L. Memory--a century of consolidation. Science, v.287, n.5451, Jan 14, p.248-51. 2000.

Meunier, J., J. Ieni, *et al.* The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor. Br J Pharmacol, v.149, n.8, Dec, p.998-1012. 2006.

Meunier, M. e E. Barbeau. Recognition memory and the medial temporal lobe: From monkey research to human pathology. Rev Neurol (Paris), Mar 6. 2013.

Milner, B., L. R. Squire, *et al.* Cognitive neuroscience and the study of memory. Neuron, v.20, n.3, Mar, p.445-68. 1998.

Mitrushina, M., P. Satz, *et al.* The differential pattern of memory deficit in normal aging and dementias of different etiology. J Clin Psychol, v.50, n.2, Mar, p.246-52. 1994.

Mizutani, T. e M. Kasahara. Hippocampal atrophy secondary to entorhinal cortical degeneration in Alzheimer-type dementia. Neurosci Lett, v.222, n.2, Jan 31, p.119-22. 1997.

Morrison, J. H. e P. R. Hof. Life and death of neurons in the aging brain. Science, v.278, n.5337, Oct 17, p.412-9. 1997.

Mortimer, J. A., B. Ebbitt, *et al.* Predictors of cognitive and functional progression in patients with probable Alzheimer's disease. Neurology, v.42, n.9, Sep, p.1689-96. 1992.

Nebes, R. D., D. C. Martin, *et al.* Sparing of semantic memory in Alzheimer's disease. J Abnorm Psychol, v.93, n.3, Aug, p.321-30. 1984.

Norton, S., F. E. Matthews, *et al.* A commentary on studies presenting projections of the future prevalence of dementia. BMC Public Health, v.13, n.1, Jan 2, p.1. 2013.

Olariu, A., M. H. Tran, *et al.* Memory deficits and increased emotionality induced by beta-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. J Neural Transm, v.108, n.8-9, p.1065-79. 2001.

Ondo, W. G. Pooled analysis of two identical phase 3 studies of a novel selegiline preparation as adjuvantive therapy for Parkinson's disease. Paper presented at: the World Parkinson Congress. Washington, DC, 2006. p.

Pahwa, R., S. A. Factor, *et al.* Practice Parameter: treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology, v.66, n.7, Apr 11, p.983-95. 2006.

Perry, R. J. e J. R. Hodges. Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. Brain, v.122 (Pt 3), Mar, p.383-404. 1999.

Petersen, R. C. Guia da Clínica Mayo sobre o Mal de Alzheimer. Tradução: Marcos José Cunha. RJ: Anima. 2006

Pitsikas, N., A. E. Rigamonti, *et al.* The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. Neurobiol Aging, v.26, n.2, Feb, p.259-64. 2005.

Price, J. L., A. I. Ko, *et al.* Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. Arch Neurol, v.58, n.9, Sep, p.1395-402. 2001.

Prince, M., R. Bryce, *et al.* The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. Alzheimers Dement, v.9, n.1, Jan, p.63-75 e2. 2013.

Reinikainen, K. J., H. Soininen, *et al.* Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnostics and therapy. J Neurosci Res, v.27, n.4, Dec, p.576-86. 1990.

Reynolds, G. P., P. Riederer, *et al.* Amphetamine and 2-phenylethylamine in post-mortem Parkinsonian brain after (-)deprenyl administration. J Neural Transm, v.43, n.3-4, p.271-7. 1978.

Sano, M., C. Ernesto, *et al.* A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. N Engl J Med, v.336, n.17, Apr 24, p.1216-22. 1997.

Sant' Anna Gda, S., P. Machado, *et al.* Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett, v.19, n.2, Jan 15, p.546-9. 2009.

Saura, J., J. M. Luque, *et al.* Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. Neuroscience, v.62, n.1, Sep, p.15-30. 1994.

Scorer, C. A. Preclinical and clinical challenges in the development of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. Drug Discov Today, v.6, n.23, p.1207-1219. 2001.

Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. J Neuropathol Exp Neurol, v.53, n.5, Sep, p.438-47. 1994.

Shih, J. C., K. Chen, *et al.* Monoamine oxidase: from genes to behavior. Annu Rev Neurosci, v.22, p.197-217. 1999.

Simpson, L. L. Evidence that deprenyl, A type B monoamine oxidase inhibitor, is an indirectly acting sympathomimetic amine. Biochem Pharmacol, v.27, n.11, p.1591-5. 1978.

Son, S. Y., J. Ma, *et al.* Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.15, Apr 15, p.5739-44. 2008.

Sparks, D. L., V. M. Woeltz, *et al.* Alterations in brain monoamine oxidase activity in aging, Alzheimer's disease, and Pick's disease. Arch Neurol, v.48, n.7, Jul, p.718-21. 1991.

Spires, T. L. e B. T. Hyman. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. NeuroRx, v.2, n.3, Jul, p.423-37. 2005.

Squire, L. R. e E. R. Kandel. Memória. Artmed, Porto Alegre. 2002

Strolin-Benedtti, M. e P. Dostert. Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. Adv. Drug. Res, v.23, p.65-125. 1992.

Suh, E. C., Y. J. Jung, *et al.* A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures. Neurotoxicology, v.29, n.4, Jul, p.691-9. 2008.

Takahata, K., A. Minami, *et al.* Effects of selegiline alone or with donepezil on memory impairment in rats. Eur J Pharmacol, v.518, n.2-3, Aug 22, p.140-4. 2005.

Tariot, P. N., R. M. Cohen, *et al.* L-deprenyl in Alzheimer's disease. Preliminary evidence for behavioral change with monoamine oxidase B inhibition. Arch Gen Psychiatry, v.44, n.5, May, p.427-33. 1987.

Taylor, K. I. e A. Probst. Anatomic localization of the transentorhinal region of the perirhinal cortex. Neurobiol Aging, v.29, n.10, Oct, p.1591-6. 2008.

Terry, R. D., E. Masliah, *et al.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Ann Neurol, v.30, n.4, Oct, p.572-80. 1991.

Tetrud, J. W. e J. W. Langston. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. Science, v.245, n.4917, Aug 4, p.519-22. 1989.

Thomas, T. Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, v.21, n.2, Mar-Apr, p.343-8. 2000.

Thomas, T., C. Mclendon, *et al.* L-deprenyl: nitric oxide production and dilation of cerebral blood vessels. Neuroreport, v.9, n.11, Aug 3, p.2595-600. 1998.

Tiller, J. W. Clinical overview on moclobemide. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.17, n.5, Sep, p.703-12. 1993.

Tran, M. H., K. Yamada, *et al.* Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. Faseb J, v.15, n.8, Jun, p.1407-9. 2001.

Treves, A. e I. Samengo. Standing on the gateway to memory: Shouldn't we step in? Cogn Neuropsychol, v.19, n.6, Sep 1, p.557-75. 2002.

Tsunekawa, H., Y. Noda, *et al.* Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35). Behav Brain Res, v.190, n.2, Jul 19, p.224-32. 2008.

Varadarajan, S., J. Kanski, *et al.* Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). J Am Chem Soc, v.123, n.24, Jun 20, p.5625-31. 2001.

Villarinho, J. G., S. M. Oliveira, *et al.* Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. Eur J Pharmacol, v.690, n.1-3, Sep 5, p.107-14. 2012.

Vindis, C., M. H. Seguelas, *et al.* Monoamine oxidase B induces ERK-dependent cell mitogenesis by hydrogen peroxide generation. Biochem Biophys Res Commun, v.271, n.1, Apr 29, p.181-5. 2000.

Wang, D., Y. Noda, *et al.* The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. Neuropsychopharmacology, v.32, n.6, Jun, p.1261-71. 2007.

Waters, C. H., K. D. Sethi, *et al.* Zydys selegiline reduces off time in Parkinson's disease patients with motor fluctuations: a 3-month, randomized, placebo-controlled study. Mov Disord, v.19, n.4, Apr, p.426-32. 2004.

Weidemann, A., G. Konig, *et al.* Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. Cell, v.57, n.1, Apr 7, p.115-26. 1989.

West, M. J., P. D. Coleman, *et al.* Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. Lancet, v.344, n.8925, Sep 17, p.769-72. 1994.

Wilcock, G. K., J. Birks, *et al.* The effect of selegiline in the treatment of people with Alzheimer's disease: a meta-analysis of published trials. Int J Geriatr Psychiatry, v.17, n.2, Feb, p.175-83. 2002.

Winters, B. D., S. E. Forwood, *et al.* Double dissociation between the effects of perirhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial

memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. J Neurosci, v.24, n.26, Jun 30, p.5901-8. 2004.

Youdim, M. B., D. Edmondson, *et al.* The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. Nat Rev Neurosci, v.7, n.4, Apr, p.295-309. 2006a.

Youdim, M. B. H. e Y. S. Bakhle. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. Brit. J. Pharmacol, v.147, p.287-296. 2006b.

Zeng, Y. C., S. Bongrani, *et al.* Effect of long-term treatment with L-deprenyl on the age-dependent microanatomical changes in the rat hippocampus. Mech Ageing Dev, v.79, n.2-3, Apr 14, p.169-85. 1995.

Zisook, S. A clinical overview of monoamine oxidase inhibitors. Psychosomatics, v.26, n.3, Mar, p.240-6, 251. 1985.

Zubenko, G. S., J. Moosy, *et al.* Neuropathologic and neurochemical correlates of psychosis in primary dementia. Arch Neurol, v.48, n.6, Jun, p.619-24. 1991.