

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

NATASHA MAURMANN

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MOLÉCULAS DE
MANGIFERA INDICA E DE *VALERIANA GLECHOMIFOLIA***

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

NATASHA MAURMANN

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MOLÉCULAS DE
MANGIFERA INDICA E DE *VALERIANA GLECHOMIFOLIA***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Roesler
Coorientador: Dr. Arthur Germano Fett Neto

Porto Alegre

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natasha Maurmann

Avaiiação pré-clínica de atividades biológicas de moléculas de
Mangifera indica e de *Valeriana glechomifolia*

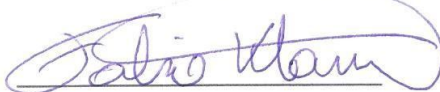
Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBCM/UFRGS) como requisito parcial para
a obtenção do grau de Doutor em Ciências



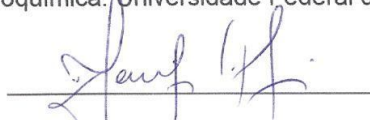
Prof. Dr. Rafael Roesler
Orientador. PPGBCM/UFRGS
Departamento de Farmacologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul



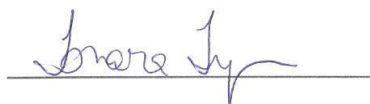
Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto
Coorientador. PPGBCM/UFRGS
Departamento de Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul



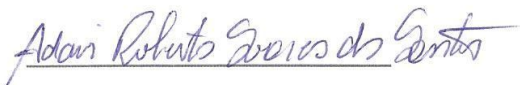
Dr. Fábio Klamt
Revisor e Membro suplente da Banca Examinadora
Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dra. Jenifer Saffi
Banca examinadora. Membro do PPGBCM/UFRGS
Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre



Prof. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira
Banca examinadora. Membro da UFRGS
Departamento de Farmacologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Banca examinadora. Membro externo
Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de Santa Catarina

Porto Alegre, 03 de setembro de 2010

INSTITUIÇÕES

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurofarmacologia Molecular – Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS, UFRGS), no Laboratório de Pesquisa em Câncer – Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE, HCPA), no Centro de Química Farmacêutica (Ciudad de La Habana, Cuba) e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Farmácia – UFRGS.

FONTES FINANCIADORAS

O trabalho teve apoio financeiro das agências: CAPES, CAPES/MES-Cuba (projeto 035/07), FAPERGS, CNPq e PROPESQ.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está formatada de acordo com a NBR 14724:2005, item 4; NBR 14724:2005, item 4.1.5; ; NBR 14724:2005, item 4.1.9; NBR 14724:2005, item 5.1; NBR 14724:2005, item 5.2; NBR 14724:2005, item 5.3; NBR 14724:2005, item 5.4; NBR 14724:2005, item 5.9; NRB 6023:2003; NRB 6024:2003, item 3.2; NRB 6024:2003, item 3.3.5, bem como com as normas do Manual para a apresentação de dissertações de mestrado e teses de doutorado do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEDICATÓRIA

*No dia do Biólogo, data desta defesa, dedico minha tese
aos colaboradores*

*Dr. Rafael Roesler
Dr. Arthur Germano Fett Neto
Dr. Fábio Klamt
Bel. Karyne Maurmann*

*às farmacêuticas
Dr^a. Sandra Beatriz Rech
Dr^a. Nadja Shörder*

*aos familiares
Eng. Jorge Tadeu Maurmann
Ped. Aínda Maria Silva Maurmann
Bel. Anna Maurmann*

*e aos pesquisadores que com tanto empenho compartilharam seus
conhecimentos e muito contribuíram para minha formação como Doutora em
Biologia Celular e Molecular*

AGRADECIMENTOS

Com enorme alegria, agradeço ao meu orientador, o Professor Dr. Rafael Roesler, pela grande oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação. Por toda confiança e liberdade que me permitiu realizar o trabalho, proporcionando meu aprimoramento profissional e pessoal.

Pelas preciosas dicas gerando soluções simples. Agradeço também à professora Nadja e ao Rafa pela oportunidade de fazer o pós-doutorado e assim continuar minha dedicação à ciência e à vida acadêmica.

Ao meu coorientador, o Professor Dr. Arthur Fett Neto agradeço pelo exemplo de profissional, pela coerência, pela dedicação e pela experiência que me adicionou com seus ensinamentos e sua sabedoria.

À Professora Dr^a. Sandra Beatriz Rech, minha mãe científica, sou grata pelo espaço, pelas colaborações e pelo apoio, amizade, carinho, atenção e auxílio que sempre recebi.

Aos membros da banca, por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho. Aos colegas e amigos do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do ICBS/UFRGS, alfabeticamente: Aline, Lia, Natália, Raissa, e aos meus amores, Paulo e Thiago, pelo auxílio, amizade, discussões. Em especial ao doutorando Gustavo K. Reolon, que há quatro anos me recebeu com muito coleguismo, me ajudou “me treinando” no reconhecimento de objeto, na esQUIVA inibitória e no campo aberto.

Agradeço ainda aos queridos colaboradores do Laboratório de Pesquisas em Câncer do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que com tanto carinho me receberam: Anas, Carols, Dani, Déboras, Rafa, Tiago e Vivi, pela amizade, pelas sugestões; em especial a Carol pela colaboração e pelo auxílio nos experimentos. Ao

“Clube das Luluzinhas”: Ana, Carol Brunetto e Carol Nor, Dani, Débora, Mari e Lu pela ajuda, pelo carinho, pela amizade e pela torcida para a realização deste trabalho.

Às queridas amigas, companheiras e colaboradoras do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Farmácia da UFRGS: Jéssica, Amanda e Mari. Aos funcionários da Faculdade de Farmácia/UFRGS; ao pessoal do Laboratório de Química Farmacêutica, Dr^a Ana, Marquinhos, Carol, Leo, por todo carinho, simpatia, colaborações e auxílio nas dificuldades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me permitirem a realização deste trabalho. Sou grata também pela oportunidade de entrar em contato com os excelentes profissionais e pelo auxílio financeiro. Aos professores, pelos ensinamentos bem como aos secretários do PPGBCM, Silvia e Luciano pela atenção, pelos esclarecimentos e pela ajuda nas dificuldades. À minha comissão de acompanhamento, Prof^a. Dr^a. Janette Palma Fett e Prof^a. Dr^a. Jenifer Saffi, que desde o mestrado acompanham meu trabalho. A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao pessoal do “Centro de Química Farmacéutica” de La Habana, em especial a Annia, Mariela, Carmen, Yeny, Mari, Yack e Rene, que com tanto carinho me receberam em Cuba.

À minha querida família, que pela presença em todos os momentos me ofereceu amor e apoio irrestrito. Aos meus pais, Aida e Jorge Tadeu, pela companhia e ajuda que recebi sempre que precisei e ao “paitrocinio”. Às minhas irmãs, Anna e Karyne, por todas as dicas, carinho, sugestões, apoio, paciência e auxílio nas dificuldades. Aos meus cunhados, Thiago e Vanha, que fazem minhas irmãs felizes e também me apoiaram durante o doutorado. Em especial, agradeço pela enorme amabilidade que sempre recebi e faço três homenagens póstumas: Mila, Rejane e Seu Antônio, que foram nos deixando nas últimas semanas e deixam muita saudade à família.

Às minhas amigas, companheiras e colegas que após a faculdade continuaram presentes; as farmacêuticas Ana H. Santos, Cíntia Fochesatto e Luciane Cerioli Menzen; às queridas parceiras de jantas,

Carol Lemmert e Iata, e à turma do vôlei, em especial à Jô (também da turma do espanhol), pelo carinho, apoio, dicas, auxílio e companheirismo.

À Marcele e à Camila pelo carinho e pelas correções de inglês e português. E a todas, por compreenderem minha ausência.

A Deus, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Por fim, aos cientistas que se dedicam às pesquisas que permitiram a execução desta tese e facilitaram meu bem estar, através das invenções nas áreas tecnológicas, da saúde (principalmente os analgésicos), etc.

Foram centenas de pessoas envolvidas direta ou indiretamente, que propiciaram o desenvolvimento deste trabalho e me apoiaram nos devidos momentos. Então agradeço a todos que participaram ou ajudaram a concretizar os objetivos deste trabalho. Sem estas pessoas e estas organizações, a realização desta tese não seria possível.

Muito obrigada a todos!

“Não sois máquina! Homens é que sois!”
Charles Chaplin

RESUMO

Neste estudo avaliamos atividades biológicas pré-clínicas de moléculas obtidas de *Mangifera indica* e de *Valeriana glechomifolia*. Mangiferina, isolada de *M. indica*, estimulou a proliferação celular e induziu um aumento significativo na secreção do fator de crescimento do nervo e do fator de necrose tumoral em células de glioblastoma humano U138-MG *in vitro*. Uma injeção sistêmica de mangiferina melhorou a consolidação da memória de longa duração (LTM) de reconhecimento de objetos (RO) e prejudicou a retenção da memória aversiva no teste da esQUIVA inibitória (EI) em ratos. A melhora da LTM no RO promovida pela administração sistêmica de mangiferina também foi observada com a administração intrahipocampal. Já o prejuízo da memória no teste da EI observado sistemicamente não ocorreu com a infusão no hipocampo ou amígdala. Camundongos atáxicos também apresentaram melhora na memória de RO após administração crônica de mangiferina, sem efeito na EI; um extrato comercializado de *M. indica* não afetou a memória no RO, mas facilitou a memória na EI. Os resultados indicam que mangiferina melhora a LTM no RO com envolvimento do hipocampo por meio de um mecanismo que pode envolver um aumento dos níveis da neurotrofina NGF e da citocina TNF- α . Valepotriatos, isolados de *V. glechomifolia*, demonstraram inibição da viabilidade de células tumorais U138-MG nas doses de 30 e 100 μ g/ μ l; o 8-Br-AMPC, um análogo do AMPc, atenuou a inibição dos valepotriatos na viabilidade celular, sugerindo que os valepotriatos interagem com a rota de sinalização celular do AMPc/PKA na inibição da viabilidade de células cancerosas. A administração sistêmica de valepotriatos, em camundongos 30 minutos antes dos testes, apresentou os seguintes resultados: durante a exploração no campo aberto, a dose 10mg/kg causou redução na locomoção e no comportamento exploratório e diminuição da ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado. Não ocorreu diferença entre os tratamentos na memória de EI e na memória RO, exceto no grupo que recebeu 3mg/kg de valepotriatos que apresentou piora na LTM de RO. Os resultados indicam que os valepotriatos causaram atividades ansiolítica e sedativa sem déficits na memória de EI e RO em camundongos tratados com 10mg/kg. As atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* encontradas nas moléculas estudadas (especialmente mangiferina e valepotriatos) geram interesse de investigações para utilizações terapêuticas na memória e no câncer.

Palavras-chave:

Mangifera indica – *Valeriana glechomifolia* – memória – reconhecimento de objeto novo – esQUIVA inibitória – viabilidade celular

ABSTRACT

We evaluated the biological activities of molecules obtained from *Mangifera indica* and *Valeriana glechomifolia*. Mangiferin, isolated from *M. indica*, stimulated cell proliferation and induced a significant increase in levels of nerve growth factor and tumor necrosis factor secreted in human glioblastoma cells U138-MG *in vitro*. A systemic injection of mangiferin improved long term memory (LTM) consolidation of object recognition (NOR) and impaired memory retention in aversive inhibitory avoidance test (IA) in rats. The improvement in NOR memory promoted by systemic administration of mangiferin was also observed with intrahippocampal administration. The memory impairment observed systemically in the IA did not occur with the infusion into the hippocampus or amygdala. Ataxic mice also showed improvement in NOR memory after chronic administration of mangiferin, with no effect on IA; a standardized extract of *M. indica* had no effect on memory in NOR, but facilitated the memory in IA. The results indicate that mangiferin improves NOR memory involving the hippocampus through a mechanism that may involve increased levels of neurotrophins and cytokines. Valepotriates isolated from *V. glechomifolia* showed inhibition of the viability of U138-MG tumor cells at doses of 30 and 100 µg/µl; 8-Br-cAMP, an analogue of cAMP, reversed the inhibition of valepotriates on cell viability, suggesting that valepotriates interact with the cAMP/PKA signaling route in the inhibition of the viability of cancer cells. Systemic administration of valepotriates in mice, 30 minutes before tests, showed the following results: during the open-field, the dose of 10mg/kg caused a reduction in locomotion and exploratory behavior and decreased anxiety in the test of elevated plus maze. There was no difference between treatments in IA or NOR memories, except from the group receiving valepotriates at 3mg/kg, which worsened in the NOR. The results indicated that valepotriates at 10mg/kg caused anxiolytic and sedative activities without inducing memory deficits in IA and NOR. The biological activities *in vitro* and *in vivo* found with the studied molecules (notable mangiferin and valepotriates) support further research for potential therapeutic uses in cancer and in memory.

Keywords:

Mangifera indica – *Valeriana glechomifolia* – memory – novel object recognition – inhibitory avoidance – cell viability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 CAPÍTULO 1

Figura 1.1:	Aspecto de <i>Mangifera indica</i> cultivada pela Empresa Agrícola Corralillo (Villa Clara, Cuba).....	28
Figura 1.2:	Formulações Vimang® de produção industrial.....	30
Figura 1.3:	Possíveis alvos moleculares do extrato da casca da árvore de <i>Mangifera indica</i> (ECAM) sobre o equilíbrio redox.....	33
Figura 1.4:	Mecanismo proposto de ação anti-inflamatória do extrato da casca da árvore de <i>Mangifera indica</i> (ECAM).....	34
Figura 1.5:	Diagrama dos possíveis alvos moleculares do extrato da casca da árvore de <i>Mangifera indica</i> (ECAM) na dor crônica.....	35
Figura 1.6:	Estrutura molecular da mangiferina.....	36

ARTIGO 1: Mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone improves long-term object recognition memory in rats

Fig. 1.:	Post-training ip. administration of mangiferin improves object recognition index measured 24h (long-term memory, LTM) after training in rats.....	40
Fig. 2.:	Open field behavior in rats treated with an ip. administration of DMSO-saline 20% (Control) or mangiferin (10, 50, or 100mg/kg) 24h before behavioral testing.....	40
Fig. 3.:	Stimulatory effect of mangiferin on cell viability in U138-MG human glioblastoma cells.....	41
Fig. 4.:	Effect of mangiferin on NGF (A) and TNF- α (B) levels in U138-MG culture supernatants.....	41

ARTIGO 2: Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoylxanthone, on fear memory in rats

Figure 1:	Post-training intraperitoneal administration of mangiferin impairs retention of inhibitory avoidance (IA) conditioning measured 24h (long-term memory, LTM) after training in rats. A) Control (20% DMSO in saline) or mangiferin (10, 50, or 100mg/kg) were given immediately after IA training. B) Freezing movements of Control (20% DMSO in saline) or mangiferin (10, 50, or 100mg/kg) given immediately after IA training.....	48
-----------	--	----

1.3 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 3	
Figura 1.3.1: Diagrama do corte histológico, com o complexo basolateral da amígdala marcado em azul indicando os locais das infusões...	54
Figura 1.3.2: Diagrama do corte histológico, com a região CA1 do hipocampo dorsal marcada em azul indicando os locais das infusões.....	55
 ARTIGO 3: Mangiferin reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory in rats	
Figure 1: Post-training intrahippocampal infusion of mangiferin improves novel object recognition percentage measured 24h (long-term memory, LTM) after training in rats.....	63
Figure 2: Mangiferin did not affect modulation of IA memory consolidation in the BLA or hippocampus.....	65
 ARTIGO 4: <i>Mangifera indica</i> L. extract improved the long-term memory for aversive training in spinocerebellar ataxia type 2 transgenic mice	
Figure 1: Open-field behavior and habituation in healthy wild type mice (WT) or SCA-2 (transgenic) orally treated with MiE (10, 50 or 100mg/kg) or mangiferin (mang 10mg/kg) for 12 months.....	80
Figure 2: Novel object recognition memory in healthy wild type mice (WT) or SCA-2 (transgenic) orally treated with MiE (10, 50 or 100mg/kg) or mangiferin (mang 10mg/kg) for 12 months. Memory retention was tested 24h after training.....	81
Figure 3: Fear-related memory assessed in an inhibitory avoidance task in healthy wild type mice (WT) or SCA-2 (transgenic) orally treated with MiE (10, 50 or 100mg/kg) or mangiferin (mang 10mg/kg) for 12 months. Memory retention was tested 24h after training.....	82
 2 CAPÍTULO 2	
Figura 2.1: Estrutura molecular e nomenclatura de valepotriatos.....	97
Figura 2.2: Aspecto de <i>Valeriana glechomifolia</i>	100
Figura 2.3: Viabilidade de células U138-MG após 24 horas de tratamento com extrato clorofórmico semipurificado de plantas micropropagadas de <i>Valeriana glechomifolia</i>	102
Figura 2.4: Mecanismo de produção e degradação da adenosina monofosfato cíclica.....	104
 ARTIGO 5: Inhibition of viability of U138-MG glioblastoma cells by valepotriates and the combination with agents that enhance cAMP signaling	
Figure 1: Valepotriates combined with stimulators of the cAMP/PKA signaling pathway in the proliferation of U138-MG human glioblastoma cells <i>in vitro</i>	110
 ARTIGO 6: Neuropharmacological profile of a valepotriate extract fraction of <i>Valeriana glechomifolia</i> in mice	
Figure 1: Open-field behavior and habituation in mice treated with a	

	systemic administration of VF (1, 3 or 10mg kg ⁻¹) of <i>V. glechomifolia</i> 30min before the first open-field exploration session. (a) Latency to start locomotion (s), (b) number of fecal pellets, (c) number of crossings and (d) number of rearings.....	119
Figure 2:	Elevated plus-maze behavior in mice treated with a systemic administration of VF (1, 3 or 10mg kg ⁻¹) of <i>V. glechomifolia</i> 30min before behavioral testing. The following parameter is shown: percentage open-arm time.....	119
Figure 3:	Novel object recognition memory in mice treated with a systemic administration of VF (1, 3 or 10mg kg ⁻¹) of <i>V. glechomifolia</i> 30min before the training. Memory retention was tested 24 hours after training.....	120
Figure 4:	Fear-related memory assessed in an inhibitory avoidance task in mice treated with a systemic administration of VF (1, 3 or 10mg kg ⁻¹) of <i>V. glechomifolia</i> 30min before training. Memory retention was tested 24h after training.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AA:	ácido araquidônico
a.C.:	<i>Ante Christi</i> (antes de Cristo)
AIDS:	“Acquired Immune Deficiency Syndrome” (síndrome da imunodeficiência adquirida)
am e a.m.:	<i>Ante meridian</i> (antes do meio dia)
AMPA:	“ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic” (amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico)
AMPc:	monofosfato de adenosina cíclica
ANOVA:	“analysis of variance” (análise de variância)
ATP:	adenosina trifosfato
bar:	unidade de pressão
BLA:	“basolateral amygdala” (amígdala basolateral)
BLACPMA:	“Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas” (Boletim Latinoamericano e do Caribe de Plantas Mediciniais e Aromáticas)
Ca ²⁺ :	cálcio
CA1:	<i>Cornu Ammonis</i> (região CA1 do hipocampo)
CaMKII:	“calcium-calmodulin-dependent protein kinase II” (proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina)
cAMP:	“cyclic adenosine monophosphate” (monofosfato de adenosina cíclica)
CAMs:	“Complementary and Alternative Medicines” (medicinas alternativas e complementares)
CAPEC:	Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; “Coordination for the Improvement Higher Education Personnel”
CCAC:	“Canadian Council on Animal Care” (Conselho Canadense de Cuidado com Animais)
CIGB:	“Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología” (Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia)

cm:	centímetro
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; “National Counsel of Technological and Scientific Development”
CNS:	“Central Nervous System” (sistema nervoso central)
Resolução CNS:	Resolução do Conselho Nacional de Saúde
CO ₂ :	gás carbônico, dióxido de carbono
COBEA:	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; “Brazilian College of Laboratory Animals”
COX-2:	ciclooxigenase 2; “cyclooxygenase-2”
CPE/HCPA:	Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
CREAL/UFRGS:	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
CREB:	“cAMP response element-binding protein” (proteína de ligação do elemento de resposta a cAMP)
DMSO:	dimetil sulfóxido; “dimethyl sulfoxide”
DNA:	“deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico)
DNAC:	ácido desoxirribonucleico complementar
Dr. :	doutor
Dra. :	doutora
DW:	“dry weight” (peso seco)
e-CAM:	“Evidence Based Complementary and Alternative Medicine” (Medicina Complementar e Alternativa Baseada em Evidências)
ECAM:	Extrato da Casca da árvore de <i>Mangifera indica</i> ; Vimang®
Elisa:	“Enzyme-linked immunosorbent assay” (ensaio imuno-absorvente ligado à enzima)
EP2:	receptor da prostaglandina E2
ERK:	“Ras extracellular-signal-regulated kinase” (proteína quinase regulada por sinal extracelular)
ERO:	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>et al.</i> :	<i>et alii</i> (e outros, e outras)
FAPERGS:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul
FDA:	“Food and Drug Administration”
Fe ²⁺ :	íon ferroso
Fe ³⁺ :	íon férrico
FEPPS:	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde; “State Foundation for Health Science Research”

g:	grama
GABA:	“gamma-aminobutyric acid” (ácido gama amino butírico)
G-6-P:	glicose-6-fosfato
G-6-P Dehidrogenase:	glicose-6-fosfato desidrogenase
Glu:	glutamato
GM-CSF:	fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
GMPc:	guanosina monofosfato cíclica
GPPG/HCPA:	Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
GSH:	glutadiona reduzida
GSSG:	glutadiona oxidada
¹ H NMR:	“Proton Nuclear Magnetic Resonance” (ressonância magnética nuclear de hidrogênio)
h:	horas
HIV:	“Human Immunodeficiency Virus” (vírus da imunodeficiência humana)
H ₂ O:	água
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
HO [•] :	radical hidroxil
HPLC:	“High Pressure Liquid Chromatography” (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
FIPE/HCPA:	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IA:	“inhibitory avoidance” (esquiva inibitória)
ICI-RS:	Instituto do Câncer Infantil; “Children’s Cancer Institute”
IgE:	imunoglobulina E
IL-1:	interleucina 1
INCT-TM:	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Pesquisa Translacional em Medicina; “National Science and Technology Institute for Translational Medicine”
iNOS:	“inducible Nitric Oxide Synthase” (óxido nítrico sintase induzível)
i.p.:	intraperitoneal; “intraperitoneal”
K:	Kelvin
kg:	quilograma
LPO:	lipoperoxidação
LTB ₄ :	leucotrieno B ₄

LTM:	“Long-Term Memory” (memória de longa duração)
µg:	micrograma
µl:	microlitro
Mang:	mangiferina; “mangiferin”
MAO:	monoamino oxidase
MAPK:	“Mitogen-Activated Protein Kinase” (proteína quinase ativada por mitógeno)
MES/Cuba:	“Ministerio de Educación Superior de Cuba” (Ministério da Educação Superior de Cuba)
mg:	miligrama
MIÉ:	<i>Mangifera indica</i> L. extract (Extrato da Casca da árvore de <i>Mangifera indica</i>)
min:	minuto
<i>M. indica</i> :	<i>Mangifera indica</i>
ml:	mililitro
mm:	milímetro
mRNA:	“messenger Ribonucleic acid” (ácido ribonucleico mensageiro)
MS:	massa seca
MTT:	“assay 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide” (ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo)
MΔ:	meio de cultura Murashige & Skoog modificado
NADPH:	“nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, in the reduced form” (nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato, na forma reduzida)
NADP ⁺ :	“nicotinamide adenine dinucleotide phosphate” (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, na forma oxidada)
NF-κB:	“Nuclear Factor-kappa B” (fator de transcrição nuclear κB)
NGF:	“Nerve Growth Factor” (fator de crescimento neural)
NIH:	“National Institutes of Health” (Institutos Nacionais de Saúde)
nm:	nanômetro
nM:	nanomolar
nNOS:	óxido nítrico neuronal
NOR:	“Novel Object Recognition” (reconhecimento de objeto)
NMDA:	“N-methyl-D-aspartate” (N-metil-D-aspartato)
O ₂ :	oxigênio molecular
O ₂ ^{-•} :	radical superóxido

OD:	optical density (densidade óptica)
P:	significância estatística
P-450:	enzimas do citocromo P450
PDE4:	“Phosphodiesterase type 4” (Fosfodiesterase tipo 4)
PhD.:	“Philosophiae Doctor” (Doutor em Filosofia)
PhRMA:	“Pharmaceutical Research and Manufacturers of America”
PHS:	prostaglandina H sintase
pg:	picograma
PGE2:	prostaglandina E2
PI3:	phosphatidylinositol 3 (fosfatidilinositol 3-fosfato)
PI3K:	phosphatidylinositol 3-kinase (fosfatidilinositol 3-quinase)
PKA:	protein kinase A (proteína quinase A)
PKC:	protein kinase C (proteína quinase C)
PLA2:	phospholipase (fosfolipase A2)
PLC:	phospholipase C (fosfolipase C)
pm, p.m.:	<i>post meridiem</i> (depois do meio dia)
p.o.:	“per oral” (por via oral)
PPGBCM:	Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
®:	marca registrada
RDC:	Resolução da Diretoria Colegiada
RO:	reconhecimento de objeto
RNA _m :	ácido ribonucleico mensageiro
RS:	Rio Grande do Sul
s:	segundos
SAEF:	Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos
SBNeC:	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento; “Brazilian Society for Neuroscience and Behavior”
SCA-2:	“spinocerebellar ataxia type-2” (ataxia espinocerebelar do tipo 2)
SCAs:	“spinocerebellar ataxias” (ataxias espinocerebelares)
SC-CO ₂ :	“Supercritical Carbon Dioxide” (extração com fluido supercrítico)
SEM, S.E.M:	“Standard Error of the Mean” (erro padrão da média)
SFE:	“supercritical fluid extraction” (extração com fluido supercrítico)
SNC:	sistema nervoso central
SOD:	superóxido dismutase
sp.:	espécie

SPSS:	“Statistical Package for the Social Sciences”
TLC:	“Thin Layer Chromatography” (cromatografia em camada delgada)
TNF- α :	“Tumor Necrosis Factor α ” (fator de necrose tumoral alfa)
TNF-R1:	“Tumor Necrosis Factor Receptor 1” (receptor 1 do fator de necrose tumoral)
U138-MG:	linhagem celular de glioma humano
UFRGS:	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV/VIS:	“ultraviolet-visible spectrophotometry” (espectroscopia no ultravioleta visível)
<i>V. glechomifolia</i> :	<i>Valeriana glechomifolia</i>
VF:	“valepotriate fraction” (fração de valepotriatos)
v/v:	volume por volume
vs.:	versus
WT:	wild type (tipo selvagem)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	22
OBJETIVOS.....	26
OBJETIVO GERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS E APRESENTAÇÃO.....	26
1 CAPÍTULO 1.....	28
1.1 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 1.....	37
ARTIGO 1.....	38
1.2 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 2.....	43
ARTIGO 2.....	44
1.3 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 3.....	54
ARTIGO 3.....	56
1.4 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 4.....	70
ARTIGO 4.....	72
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO CAPÍTULO 1.....	87
2 CAPÍTULO 2.....	93
2.1 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 5.....	101
ARTIGO 5.....	105
2.2 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 6.....	115
ARTIGO 6.....	115
2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO CAPÍTULO 2.....	123
3 DISCUSSÃO.....	134

CONCLUSÃO	146
OBRAS CONSULTADAS.....	148
PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DE TRABALHO.....	159
APÊNDICE A: NATASHA MAURMANN, <i>CURRICULUM VITAE</i> RESUMIDO.....	160

INTRODUÇÃO GERAL

Historicamente, a maioria das descobertas de fármacos de interesse terapêutico tem sido realizada a partir de produtos naturais e de compostos derivados de produtos naturais (LI e VEDERAS, 2009). As substâncias provenientes de fontes naturais caracterizam-se por possuir uma grande variabilidade de estruturas químicas, que explicam as suas mais variadas atividades biológicas (ZHANG e WILKINSON, 2007). Cerca de 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, utiliza os extratos de produtos naturais e seus derivados como sua primeira opção para o tratamento terapêutico na atenção primária da saúde (MAHADY, 2001). Além da utilização de extratos, a indústria farmacêutica iniciou uma era onde as pesquisas e o investimento para a obtenção de medicamentos a partir de compostos purificados de plantas permitem a administração de doses precisas, que não variam com a fonte ou a idade do material (LI e VEDERAS, 2009).

Mais de 80% da biodiversidade encontrada nos organismos terrestres e marinhos (fungos, bactérias, plantas e animais) ainda não foi descrita pela ciência moderna; devido as alterações climáticas em nosso planeta, em termos de perda de habitat e da biodiversidade, são interessantes pesquisas de produtos naturais visando o desenvolvimento de medicamentos (CHOUDHARY, 2008).

A descoberta de medicamentos que não tenham sido previamente testados como alvos terapêuticos é difícil e trabalhosa (DESHAIES, 2009). Para o desenvolvimento de novos fitoterápicos, que são medicamentos cujos princípios ativos são exclusivamente derivados de drogas vegetais (BRASIL. Resolução RDC 48/2004), são realizadas pesquisas químicas e farmacológicas objetivando a produção de conhecimento capaz de gerar compreensão de atividades biológicas dos compostos obtidos a partir das plantas medicinais (CECHINEL e YUNES, 1998). As inovações resultantes de estudos nos cuidados com a saúde e o

desenvolvimento de novas tecnologias médicas têm resultado em mudanças benéficas na capacidade de tratar doenças e melhorar a qualidade de vida das pessoas (DIMASI *et al.*, 2003).

Houve no Brasil, especialmente na última década, avanços importantes na área de pesquisa e de desenvolvimento de medicamentos; embora ainda existam desafios a serem vencidos, as condições necessárias para superá-los foram ou estão sendo criadas (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008). Com o governo convencido de que a ciência é uma parte essencial de uma economia em crescimento, os pesquisadores brasileiros nunca conheceram tempos melhores de investimento na ciência (PETHERICK, 2010).

Além dos investimentos de Universidades na pesquisa básica, a indústria farmacêutica, em alguns países, investe em pesquisas de bioprospecção, mesmo tendo em conta que a pesquisa de novos fármacos é um mercado de alto risco. Estima-se que entre 5.000 a 10.000 candidatos a fármacos submetidos à fase de testes pré-clínicos e clínicos apenas um é aprovado pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para comercialização, segundo a “Pharmaceutical Research and Manufacturers of America” (PhRMA, 2005), com um custo médio para o lançamento de até um bilhão de dólares, sendo que todo o processo, desde a descoberta da molécula, a realização de testes pré-clínicos e clínicos à entrada de um novo medicamento no mercado, pode levar entre 6 e 12 anos (ADAMS e BRANTNER, 2010).

Nas pesquisas com novos fármacos estabeleceu-se classicamente a etapa pré-clínica e a etapa clínica (dividida nas fases I, II, III e IV) (GOODMAN e GILMAN, 2006). Para a comprovação de atividades farmacológicas, a etapa pré-clínica é realizada *in vitro* ou em animais de laboratório para estudos de toxicidade, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco; ela inclui testes teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (MIRANDAV e HOSSNE, 2010). A fase pré-clínica deve gerar informações que permitam justificar a realização de pesquisas em seres humanos. Os resultados pré-clínicos devem permitir demonstrar a relevância dos achados, as possíveis aplicações terapêuticas e antever alguns dos riscos com o seu uso (BRASIL CNS. Resolução CNS 251/97).

A pesquisa científica contribui com ponderável parcela para o bem estar do homem e dos animais, entretanto, os conhecimentos da biologia nem sempre podem ser obtidos somente pela observação e pelo registro e, portanto, a

experimentação científica é necessária para que o ciclo do conhecimento se complete e se renove (PAIVA *et al.*, 2005). A pesquisa de novos compostos para tratamentos de enfermidades motiva a regulamentação das atividades de pesquisa envolvendo animais e seres humanos (GOLDIM, 2007). Estuda-se o desenvolvimento de métodos alternativos à utilização de animais de laboratório, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos *in vitro*; porém, esses métodos precisam ser validados para utilizar o menor número possível de espécimes animais (BALLS e FENTEM, 1997; DE TORRES *et al.*, 1997; European Commission, 2006). Portanto, modelos animais são ferramentas úteis e muitas vezes a única alternativa plausível para estudar os efeitos biológicos de produtos naturais.

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicina humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação (COBEA. Princípios éticos na experimentação animal, 1991). Anteriormente à aprovação da legislação brasileira, seguíamos as regulamentações e as normas de princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), bem como diretrizes internacionais, como o "Canadian Council on Animal Care" (CCAC) e o "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes". Em outubro de 2008, foi aprovada pelo Congresso Nacional a Lei Arouca (Lei 11794), que estabelece procedimentos para o uso de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica.

Os estudos moleculares e celulares do potencial terapêutico de constituintes de plantas medicinais, tais como flavonoides, alcaloides, taninos, lignanas, terpenoides, quinonas etc, tem sido alvo de pesquisas pré-clínicas (PHILLIPSON, 2001). Muitas atividades biológicas de compostos obtidos a partir de plantas foram descritas, dentre as quais se pode citar: antioxidantes, antivirais e antitumorais, espasmolíticas, antidiabéticas, imunoestimulantes, analgésicas e anti-inflamatórias, antimicrobianas, citotóxicas, antiparasitárias, moluscidas, hemolíticas, hepatoprotetoras, antifúngicas, anticolinesterásicas, alelopáticas,

ansiolíticas, sedativas e na memória (BHATTACHARYA *et al.*, 1972; BOUNTHANH *et al.*, 1981; GUHA *et al.*, 1996; ICHIKI *et al.*, 1998; MIURA *et al.*, 2001; CHANMAHASATHIEN *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2003; GARRIDO *et al.*, 2004a; 2004b; SRIVASTAVA *et al.*, 2005; GOTTLIEB *et al.*, 2006; LI e VEDERAS, 2009; MAURMANN *et al.*, 2010; PARDO-ANDREU *et al.*, 2010).

As atividades farmacológicas de compostos extraídos de fontes naturais revolucionaram a medicina; podem ser citados como exemplos analgésicos (morfina), antibióticos (penicilina, tetraciclina, eritromicina), antiparasitários (avermectina), antimaláricos (quinino, artemisinina), hipocolesterolêmicos (lovastatina e análogos), imunossuppressores para o transplante de órgãos (ciclosporina, rapamicina) (LI e VEDERAS, 2009) e diversas moléculas antineoplásicas isoladas de plantas (paclitaxel, doxorubicina, camptotecina, vincristina, vimblastina, podofilotoxina, combretastatinas, etc) (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). Modificações realizadas na estrutura de produtos naturais produziram melhores análogos em relação à atividade, toxicidade ou solubilidade, resultando em fármacos de sucesso, como o topotecano, o irinotecano, o docetaxel (taxotere®), o etoposídeo e o teniposídeo (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). Assim, a indústria farmacêutica reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares quimicamente e espacialmente complexas, de alto peso molecular, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Com o objetivo de estudar as atividades biológicas de moléculas obtidas de produtos naturais e com base nas propriedades farmacológicas descritas na literatura, na presente tese foram elaborados experimentos *in vitro* e *in vivo* para o estudo pré-clínico de compostos obtidos de duas plantas medicinais: *Mangifera indica* e *Valeriana glechomifolia*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Esta tese avaliou atividades biológicas pré-clínicas, na viabilidade celular e na memória, de um extrato padronizado de *Mangifera indica*, de mangiferina (o composto majoritário do extrato), e dos valepotriatos majoritários extraídos de *Valeriana glechomifolia*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E APRESENTAÇÃO

Visou-se avaliar o efeito na proliferação celular *in vitro* e alguns parâmetros neurocomportamentais *in vivo* de compostos obtidos de *Mangifera indica* e *Valeriana glechomifolia*, conforme as divisões abaixo.

Para ordenar os assuntos abordados, o trabalho está apresentado na forma de 2 capítulos, cada um enfocando uma das plantas.

O capítulo 1 apresenta uma pequena introdução e os experimentos realizados com *M. indica*. Esse capítulo está subdividido em 4 artigos:

No Artigo 1, “**Mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone improves long-term object recognition memory in rats**”, reportamos a melhora da consolidação da memória no teste de reconhecimento de objeto, com a administração sistêmica de mangiferina, investigamos a viabilidade celular e propomos mecanismos celulares *in vitro*. Este artigo foi aceito para publicação no “**European Journal of Pharmacology**”.

No Artigo 2, “**Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoxylxanthone, on fear memory in rats**”, estão relatados os experimentos do efeito de três doses de mangiferina na memória, no teste de esQUIVA inibitória. Este

artigo foi enviado para publicação na revista “**Arzneimittel-Forschung/Drug Research**”.

O Artigo 3, “**Mangiferin reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory in rats**”, avalia se os efeitos na memória descritos nos dois artigos anteriores são mediados pela amígdala ou pelo hipocampo. Este artigo será submetido à revista “**Phytomedicine**”.

O Artigo 4, “**Mangifera indica L. extract improved the long-term memory for aversive training in spinocerebellar ataxia type 2 transgenic mice**”, avalia o efeito de um extrato padronizado de *M. Indica* e do composto majoritário de *M. indica* (mangiferina) em parâmetros neurocomportamentais relacionados à memória em camundongos transgênicos com o fenótipo de ataxia espinocerebelar do tipo 2. Este artigo foi enviado para publicação no “**Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**”.

O Capítulo 2 enfoca os experimentos realizados com valepotriatos isolados de *Valeriana glechomifolia* e está subdividido em dois artigos:

O Artigo 5, “**Inhibition of viability of U138-MG glioblastoma cells by valepotriates and the combination with agents that enhance cAMP signaling**”, descreve os experimentos de atividade antiproliferativa de um extrato enriquecido com valepotriatos e a interação com a via de sinalização da adenosina mono fosfato cíclica/proteína quinase A. Este artigo será submetido para a revista “**Fitoterapia**”.

O Artigo 6, “**Neuropharmacological profile of a valepotriate extract fraction of Valeriana glechomifolia in mice**”, relata os resultados do efeito neurocomportamental em camundongos de um extrato clorofórmico semipurificado de *V. glechomifolia*, com 96% de valepotriatos. Este artigo foi publicado na revista “**Evidence Based Complementary and Alternative Medicine (e-CAM)**”.

1 CAPÍTULO 1

Este capítulo inicia com a descrição de aspectos gerais de *Mangifera indica*, do ECAM (extrato da casca da árvore *M. indica*, com o nome de marca Vimang®) e de mangiferina (o polifenol majoritário encontrado em *M. Indica*). Na sequência, estão inclusos os quatro artigos do capítulo contendo os procedimentos experimentais e os resultados, bem como as referências bibliográficas do capítulo 1. Iniciamos os experimentos por meio do projeto CAPES/MES Cuba, em colaboração com os cubanos Dr. René Delgado e Dr. Gilberto L. Pardo-Andreu.

A Mangueira é uma planta de origem Asiática (Índia), conhecida desde o ano 2000 a.C., tendo de lá se difundido para a China (MARANCA, 1978). No Brasil o cultivo da mangueira foi introduzido na região do Nordeste (MEDINA *et al.*, 1981).

A espécie *Mangifera indica* L. (Figura 1.1) é uma dicotiledônea, pertencente à ordem Rutales, à família Anacardiaceae e ao gênero *Mangifera* (SINGH e JAIN, 2005-2006).



Figura 1.1: Aspecto de *Mangifera indica* cultivada pela Empresa Agrícola Corralillo (Villa Clara, Cuba).
Fonte: Núñez-Sellés *et al.* (2007)

Utilizam-se com fins terapêuticos as folhas, as sementes, a polpa e a casca da fruta. A casca do caule da árvore de manga é utilizada como material vegetal para a preparação de extratos aquosos de diferentes tipos (maceração, percolação, decocção e infusão), fazendo parte da cultura popular de mais de 30 países. A utilização do Extrato da Casca da Árvore de *Mangifera indica* (ECAM) é relatada com mais frequência em países Africanos, enquanto as folhas da árvore são usadas mais comumente em países asiáticos. As aplicações abrangem um amplo espectro de doenças e dores (menorrágicas, dentais, articulares e musculares), infecções de pele (sarna, epidermofitose), diarreia, sífilis e algumas doenças crônicas, tais como diabetes e anemia (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

Na população cubana existe o conhecimento empírico e a experiência acumulada por mais de 30 anos da utilização do ECAM. O uso específico do ECAM em Cuba não é generalizado, embora seja muito utilizado nas populações rurais.

O processo de produção do extrato da casca da mangueira para produzir um produto padronizado na forma de fitoterápico seco é o seguinte (GUILLÉN *et al.*, 2000):

- a) moagem e tamisação;
- b) extração com solvente (água) até esgotamento;
- c) separação sólido-líquido (da casca-extrato);
- d) evaporação e concentração do extrato;
- e) secagem por “Spray” atomizado, homogeneização e envase.

O “Centro de Química Farmacéutica” da Cidade de Havana investigou e desenvolveu a linha de produtos naturais Vimang® (Figura 1.2).



Figura 1.2: Formulações Vimang® de produção industrial. a) Da esquerda para a direita: suspensão saborizada (6% de ECAM); creme (1,2% de ECAM); comprimido revestido (300mg de ECAM). Fonte: CQF, 1ª edição, 1999. b) De trás para frente: extrato aquoso (2% de ECAM); xarope saborizado (5% de ECAM); pomada unguento hidrofílico (1,2% de ECAM); infusão (cascas secas). Fonte: Martínez-Sánchez *et al.* (2003)

Composição química do extrato da casca da árvore de *Mangifera indica* (ECAM)

Aos compostos orgânicos e inorgânicos que compõe o ECAM podem ser atribuídas suas atividades biológicas, suas propriedades nutricionais, farmacológicas e toxicológicas.

Os componentes identificados no ECAM estão descritos na Tabela 1 (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2003; NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

Tabela 1

Moléculas detectados no ECAM, em ordem decrescente de concentração	
Grupo químico, quantidade de conteúdo (%)	Molécula
Polifenóis e flavonoides, 40–60	Mangiferina
	(+) Catequina
	(-) Epicatequina
	Galato de propila
	Galato de metila
	Benzoato de propila
	Ácido 3,4 -dihidroxibenzoico
	Ácido gálico
	Ácido benzoico
	Terpenoides, 10–20
β -Elemeno	
β -Selineno	
α -Guaieno	
Aromandreno	
Hinesol	
β -Eudesmol	
Cicloartenol	
Ledol	
Taraxerol	
β -Chamigreno	
Bulnesol	
Açúcares livres, 3–6	
	Arabinose
	Glicose
	Galactose
Polialcoois, 2–5	Sorbitol
	Mioinositol
	Xilitol

Tabela 1, continuação

Moléculas detectadas no ECAM, em ordem decrescente de concentração	
Grupo químico, quantidade de conteúdo (%)	Molécula
Ácidos graxos, 1–5	Ácido palmítico
	Ácido oleico
	Ácido linoleico
	Ácido mirístico
	Ácido esteárico
	Ácido eicosatrienoico
	Ácido succínico
	Ácido malônico
Esferóides, 1–3	β -Sitosterol
	Campesterol
Elementos, 1–3	Potássio
	Cálcio
	Magnésio
	Ferro
	Selênio
	Cobre
	Chumbo
	Zinco

Fonte: Adaptado de Núñez-Sellés *et al.* (2007)

Os polifenóis são os compostos majoritários presentes no ECAM e se caracterizam por várias atividades biológicas. Flavonoides protegem as plantas de estresses de origem biótica e abiótica, e sua ocorrência na dieta humana participa na prevenção de doenças degenerativas. Muitas das funções biológicas de flavonoides são atribuídas a sua potencial capacidade antioxidante. A oxidação de flavonoides contribui para essas propriedades químicas e biológicas (POURCEL *et al.*, 2007). Algumas das atividades biológicas estudadas do ECAM estão ilustradas nas figuras 1.3, 1.4 e 1.5.

A figura 1.3 ilustra o esquema da atuação do ECAM no restabelecimento do equilíbrio do balanço redox mediante a eliminação do excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), devido a seus efeitos de prevenção e reparação do dano oxidativo, e de seu efeito sequestrador de ERO (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

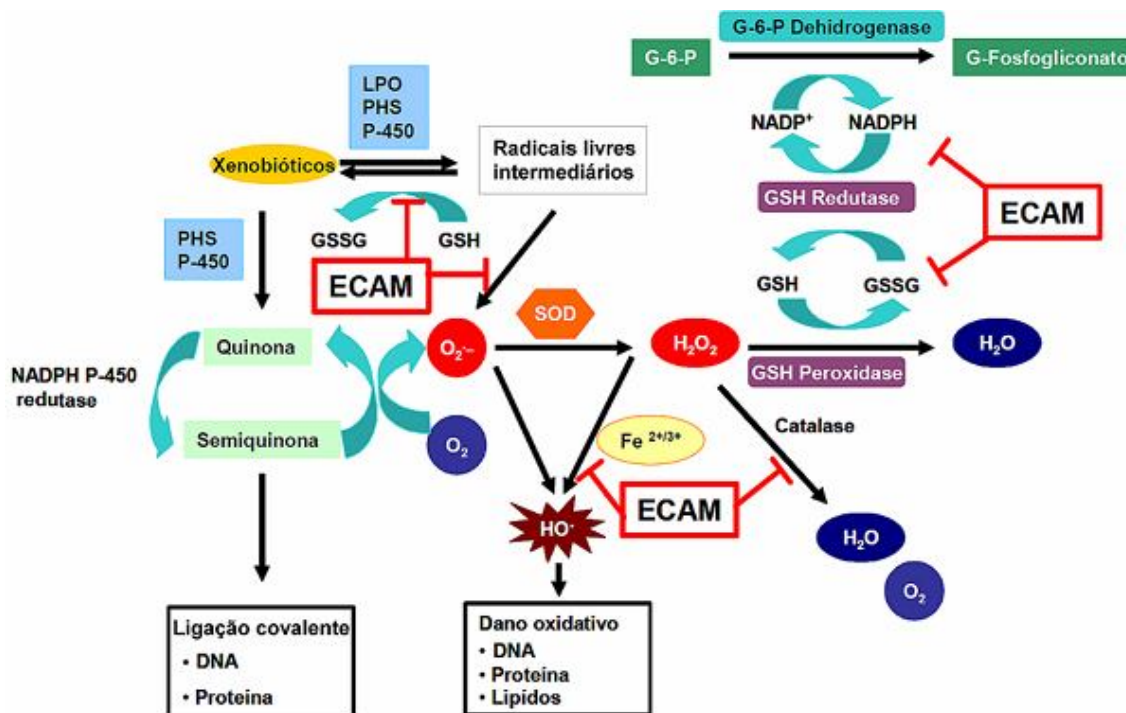


Figura 1.3: Possíveis alvos moleculares do extrato da casca da árvore de *Mangifera indica* (ECAM) sobre o equilíbrio redox. Abreviações: ECAM = extrato da casca da árvore de *M. indica*; Fe^{2+} = íon ferroso; Fe^{3+} = íon férrico; G-6-P = glicose-6-fosfato; G-6-P Desidrogenase = glicose-6-fosfato desidrogenase; G-Fosfogliconato = fosfogluconato; GSH = glutadiona reduzida; GSH Redutase = glutadiona redutase; GSH Peroxidase = glutadiona peroxidase; GSSG = glutadiona oxidada; HO^\cdot = radical hidroxil; H_2O = água; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; LPO = lipoperoxidação; NADPH = nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida); NADP^+ = nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada); O_2 = oxigênio molecular; $\text{O}_2^{\cdot-}$ = radical superóxido; PHS = prostaglandina H sintase; P-450 = enzimas do citocromo P450; SOD = superóxido dismutase. Fonte: Adaptado de Núñez-Sellés *et al.* (2007)

A figura 1.4 demonstra o processo de indução dos sinais, resultado da ativação do fator de transcrição nuclear kB (NF- kB) pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), inibido pelo ECAM. Em condições patológicas, a ativação do NF- kB induzida por TNF- α estimula a degradação do inibidor citoplasmático (I kB) do NF- kB . Após esse evento, NF- kB se transloca para o núcleo da célula para induzir síntese de RNAm de alguns mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase 2 (COX-2), interleucina 1 (IL-1) e fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF) e moléculas de adesão celular (como ICAM-1). O ECAM é também capaz de inibir outros mediadores importantes do processo inflamatório, como a fosfolipase A2 (PLA2), a prostaglandina E2 (PGE2) e o leucotrieno B4 (LTB4) (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

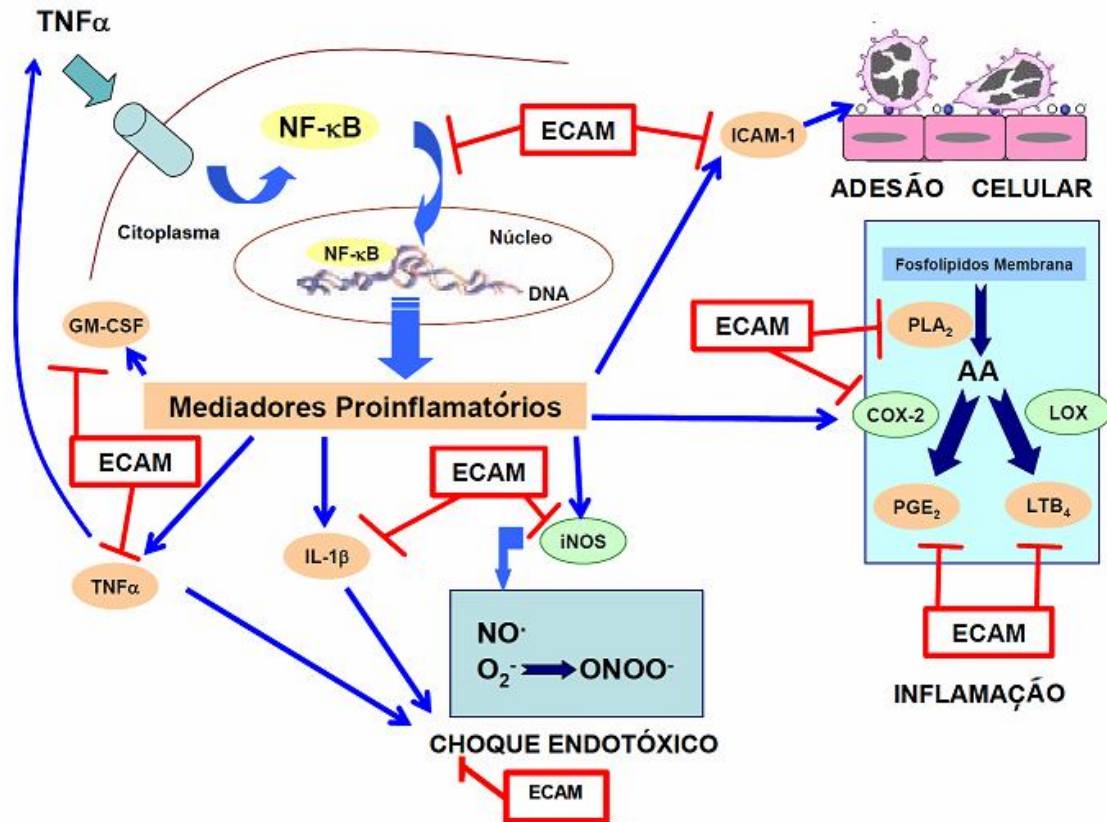


Figura 1.4: Mecanismo proposto de ação anti-inflamatória do extrato da casca da árvore de *M. indica* (ECAM). Abreviações: AA = Ácido araquidônico; COX-2 = ciclooxigenase 2; ECAM = extrato da casca da árvore de *Mangifera indica*; GM-CSF = fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos; ICAM-1 = molécula de adesão intracelular do tipo 1; IL-1 β = interleucina 1 β ; iNOS = óxido nítrico sintase induzível; LOX = lipoxigenase; LTB $_4$ = leucotrieno B4; NF- κ B = fator de transcrição nuclear κ B; NO = radical óxido nítrico; O $_2^-$ = ânion superóxido; ONOO $^-$ = peróxido nítrico; PGE $_2$ = prostaglandina E2; PLA $_2$ = fosfolipase A2; TNF- α = fator de necrose tumoral. Fonte: Adaptado de Núñez-Sellés *et al.* (2007)

A Figura 1.5 indica o efeito do ECAM na dor crônica. O extrato da casca da árvore de *M. indica* pode:

a) reduzir a liberação de glutamato pelo terminal nociceptivo a nível do corno dorsal da medula espinhal;

b) inibir a ativação do óxido nítrico neuronal promovida pelo aumento da concentração citosólica de cálcio gerado pela abertura do canal do receptor NMDA que aumenta a magnitude da despolarização e pela ativação de receptores NK1 pela substância P;

c) ativar a guanilato ciclase que aumenta as concentrações de GMPc, fecha os canais de potássio e ativa quinases dependente de GMPc que promovem a liberação de glutamato;

d) inibir a ativação de fosfolipase A2 (PLA₂) e a síntese de metabólitos do ácido araquidônico (AA), especialmente a PGE₂, que nessas condições interage com receptores EP2 pré-sinápticos que aumentam a atividade da adenilato ciclase, com a consequente formação de AMPc, que ativa a PKA dependente de AMPc, a qual também induz a liberação de glutamato e inibe a síntese ou a expressão de citocinas, a iNOS e a COX-2 mediada por NF-κB;

e) inibir a ativação de NF-κB (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

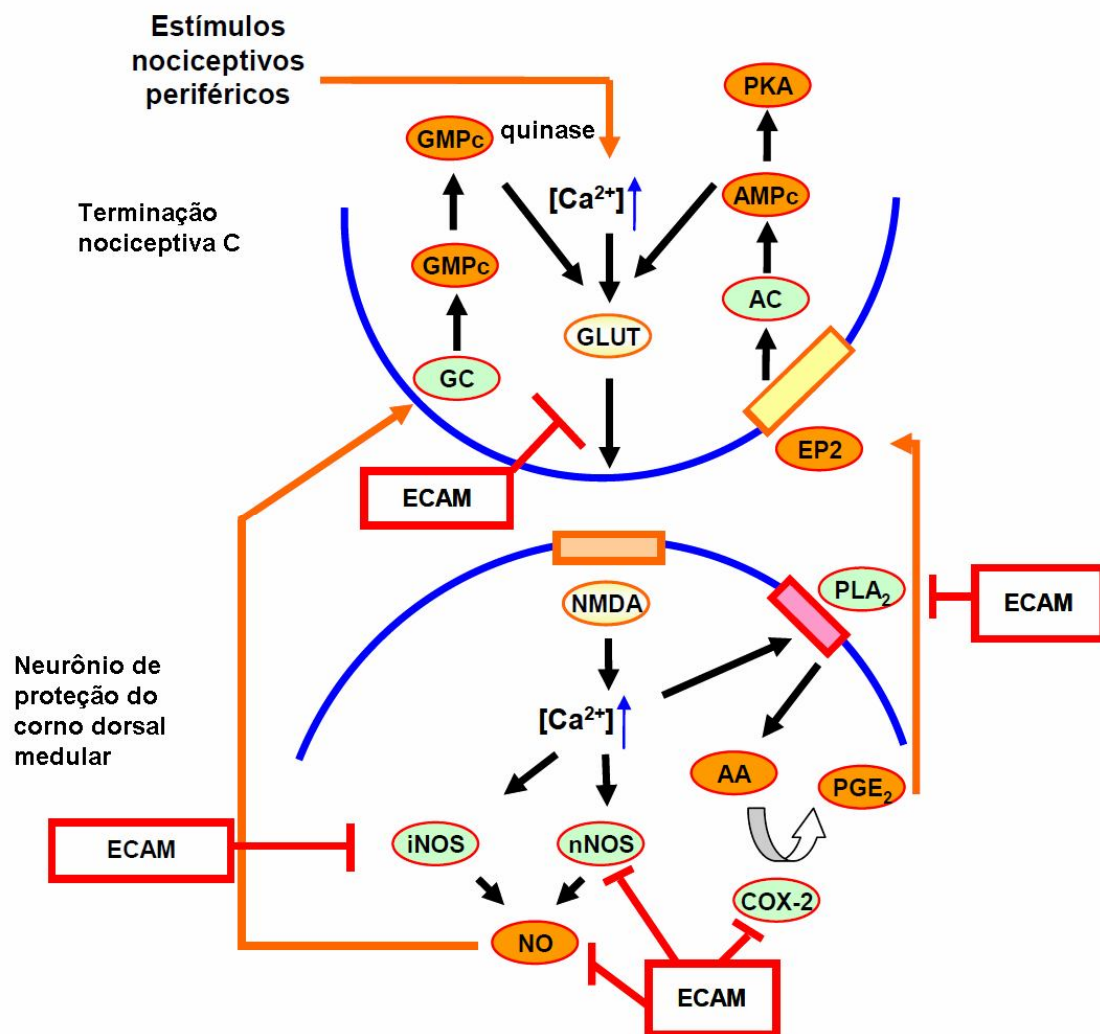


Figura 1.5: Diagrama dos possíveis alvos moleculares do extrato da casca da árvore de *Mangifera indica* (ECAM) na dor crônica. Abreviações: AA = ácido araquidônico; AC = adenilato ciclase; AMPc = adenosina monofosfato cíclica; Ca²⁺ = Cálcio; COX-2 = ciclooxigenase 2; ECAM = extrato da casca da árvore de *Mangifera indica*; EP2 = receptor de prostaglandina tipo 2; GC = guanilato ciclase; GLUT = glutamato; GMPc = guanosina monofosfato cíclica; iNOS = óxido nítrico sintase induzível; NMDA = N-metil-D-aspartato; nNOS = óxido nítrico neuronal; NO = radical óxido nítrico; PGE₂ = prostaglandina E2; PKA = proteína quinase A; PLA₂ = fosfolipase A2. Fonte: Adaptado de Núñez-Sellés *et al.* (2007)

Mangiferina

A mangiferina, 1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2- β -D-glucosídeo (Figura 1.6), está presente em diversas angiospermas (RICHARDSON, 1983). É o polifenol majoritário (de 5 a 10%) nas formulações Vimang® (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

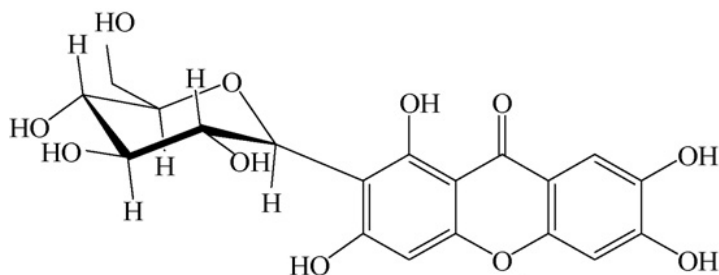


Figura 1.6: Estrutura molecular da mangiferina. Fonte: Wang *et al.* (2007)

A mangiferina apresenta diversas atividades biológicas. As mais relatadas são as antioxidantes (SATO *et al.*, 1992; PARDO-ANDREU *et al.*, 2005a; 2005b; 2006a; 2006b; 2008a; 2008b), as antivirais (ZHENG e LU, 1990; GUHA *et al.*, 1996), as antitumorais (GUHA *et al.*, 1996; YOSHIMI *et al.*, 2001), as antidiabéticas (ICHIKI *et al.*, 1998), as imunomoduladoras (LEIRO *et al.*, 2004), as anti-inflamatórias, as antialérgicas e as neuroprotetoras (GOTTLIEB *et al.*, 2006; IBARRETXE *et al.*, 2006). Esses efeitos podem ser mediados pela inibição da expressão dos genes NOS e TNF- α (LEIRO *et al.*, 2003), pela inibição da produção de IgE (RIVERA *et al.*, 2006), pela inibição da ativação de NF- κ B (LEIRO *et al.*, 2004; SARKAR *et al.*, 2004) e pela inibição da atividade da acetilcolinesterase (JUNG *et al.*, 2009).

A mangiferina utilizada nos experimentos descritos neste capítulo foi fornecida pela equipe cubana do projeto CAPES/MES Cuba (035/07). Para confirmação da identidade, realizei cromatografia líquida de alta eficiência.

1.1 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 1

Devido às atividades biológicas citadas anteriormente relacionadas com as de compostos que afetam aspectos cognitivos, investigamos os efeitos da administração sistêmica de mangiferina em um modelo pré-clínico bastante utilizado: a tarefa de reconhecimento de objeto (RO), em ratos. A memória de reconhecimento permite discriminar características familiares de novas (WAN *et al.*, 1999). Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles despendem um tempo maior para explorar o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de RO (ENNACEUR e DELACOUR, 1988), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (MOSES *et al.*, 2005; MANDOLESI *et al.*, 2003).

No artigo “Mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, improves long-term object recognition memory in rats”, reportamos o efeito de mangiferina (10, 50 ou 100mg/kg de peso corporal), administrada por via sistêmica (intraperitoneal), imediatamente após o treino para avaliação da consolidação da memória de longa duração (24h após o treino) na tarefa de RO. Como controles, realizamos a administração tardia (6h pós-treino) e avaliações na locomoção e no comportamento exploratório.

Para investigação de mecanismos moleculares que possam estar envolvidos nas atividades biológicas, adicionamos soluções de mangiferina em células de glioblastoma humano para avaliação do efeito do tratamento na viabilidade celular *in vitro* e nos níveis da neurotrofina NGF e da citocina TNF- α , secretados no meio de cultura celular.

Este artigo foi aceito para publicação no “European Journal of Pharmacology”.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Behavioural Pharmacology

Mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone improves long-term object recognition memory in rats

Gilberto L. Pardo Andreu^{a,b,c,*}, Natasha Maurmann^{b,c,d,1}, Gustavo Kellermann Reolon^{b,c,d},
Caroline B. de Farias^{b,d,e}, Gilberto Schwartzmann^{b,d,f}, René Delgado^g, Rafael Roesler^{b,c,d}

^a Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba

^b Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Children's Cancer Institute (ICI-RS) and Pediatric Oncology Service, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^g Centro Nacional para el Control de los Ensayos Clínicos, Ciudad de La Habana, Cuba

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2010

Accepted 1 March 2010

Available online 19 March 2010

Keywords:

Mangiferin

Memory

Object recognition

Nerve growth factor

Tumor necrosis factor

ABSTRACT

Mangiferin (2-β-D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone) is a xanthone widely distributed in higher plants showing antioxidative, antiviral, anticancer, antidiabetic, immunomodulatory, hepatoprotective, and analgesic effects. In the present study, we have investigated the effects of systemic administration of mangiferin on behavioral outcomes of neurological function in normal rats. A single intraperitoneal injection of mangiferin (10, 50, or 100 mg/kg body weight) enhanced novel object recognition (NOR) memory when given immediately post-training. The administration of mangiferin 6 h post-training did not affect NOR memory. There were no significant differences between groups in the total time exploring both objects, indicating that mangiferin did not affect locomotion or motivation. Mangiferin stimulated cell proliferation and induced a significant increase in the supernatant levels of nerve growth factor (NGF) and tumor necrosis factor (TNF)-α *in vitro* in human U138-MG glioblastoma cells. The results indicate that mangiferin enhances recognition memory through a mechanism that might involve an increase in neurotrophin and cytokine levels.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mangiferin is a glucosylxanthone (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-C2-β-D-glucoside) widely distributed in higher plants such as *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) (Núñez Sellés et al., 2002). This chemical is one of constituents of folk medicines and was found especially in the leaves and the bark (Guha et al., 1996).

Studies *in vitro* have shown that mangiferin has antiviral activity against herpes simplex virus (Zheng and Lu, 1990) as well as antioxidant (Sato et al., 1992; Andreu et al., 2005a, b; Pardo-Andreu et al., 2006a, b), and anti-HIV activity (Guha et al., 1996). Mangiferin given orally to rats or mice exerts biological antitumor (Guha et al., 1996), antidiabetic (Ichiki et al., 1998), antioxidant (Pardo-Andreu et al., 2008a, b), and immunomodulative (Leiro et al., 2004) activities.

Most of the above-mentioned effects are explained at least in part by inhibition of NF-κB activation (Sarkar et al., 2004; Leiro et al., 2004).

It was recently shown that mangiferin protects oligodendrocytes and cortical neurons from excitotoxic insults *in vitro* (Ibarretxe et al., 2006), prevents neuronal loss in the hippocampal CA1 region due to transient forebrain ischemia in rats and reduces neurological deficits caused by ischemic damage to the brain (Gottlieb et al., 2006).

Given the several biological actions of mangiferin and its potential as a neuroprotective agent, it is important to investigate its possible effects on the central nervous system. Therefore, in the present study, we evaluated the effects of the systemic administration of mangiferin in rats on behavioral outcomes of brain function including recognition memory. In addition, the possible mechanisms underlying the effects of mangiferin were examined in *in vitro* experiments using cultured human glioblastoma cells.

2. Materials and methods

2.1. Animals and drug administration

Male Wistar rats were obtained from the State Foundation for Health Science Research (FEPPS-RS, Porto Alegre, RS, Brazil). The

* Corresponding author. Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, ave. 23 # 21425 e/ 214 and 222, La Coronela, La Lisa, CP 13600, Ciudad Habana, Cuba. Tel.: +53 7 2719531; fax: +53 7 2736811.

E-mail address: gilbertopardo@infomed.sld.cu (G.L. Pardo Andreu).

¹ Gilberto L. Pardo Andreu and Natasha Maurmann contributed equally to this work.

animals were maintained in groups of five, in a plastic cage with sawdust bedding, in a room at temperature of 22 ± 1 °C and a 12 h light/dark cycle and were supplied with standardized pellet food and tap water *ad libitum*. All behavioral experiments took place between 9 am and 5 pm. The animals were divided in fourth group ten animals each: control group that received ip. injection of mangiferin vehicle (20% DMSO in saline solution), M-10, M-50 and M-100 groups that received ip. injection of mangiferin 10, 50, or 100 mg/kg body weight, respectively. The injections (1 ml/kg) took place either immediately or 6 h (delayed injection controls) after training. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

2.2. Novel object recognition memory

The novel object recognition (NOR) procedure uses the natural preference for novel objects displayed by rats and mice to assess cognitive alterations in rodent models of neurodevelopmental and neurodegenerative disorders or those induced by drugs.

Twenty-four hours after open field exploration (see below), animals were trained and tested in a NOR task as previously described (Schröder et al., 2003; Reolon et al., 2006). NOR training took place in the same arena used for the open field exploration, except that the arena floor was covered with sawdust during the NOR training and test trials. The open field exploration was thus used as a context habituation trial for the recognition memory task. Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (objects A1 and A2; Duplo Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. Animals were left to explore the objects until they had accumulated 30 s of total object exploration time. In a long-term memory test given 24 h after training, the rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. The NOR retention test required that the rats recalled which of two plastic objects they had been previously familiarized with. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $TB/(TA + TB)$ [TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B]. Between trials, the objects were washed with 10% ethanol solution. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on the object was not considered exploration.

2.3. Open field behavior

In order to control for possible sensorimotor effects induced by mangiferin, behavior during exploration of an open field was evaluated. The open field was a 40×45 cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed in the rear left corner and allowed to explore the field freely for 5 min. Latency to start locomotion, line crossings, rearings and the number of fecal pellets produced were counted (Reolon et al., 2006).

2.4. Cell culture

The human glioblastoma cell line U138-MG was used in this study to explore possible cellular mechanisms underlying the effects of mangiferin in the brain. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) (Farias et al., 2008). All cells were free from mycoplasma, as detected by Gen-Probe mycoplasma rapid detection kit (Fisher Scientific).

2.5. Cell viability assay

Cell viability was assessed by the MTT dye uptake (Kumar and Aggarwal, 1999) using procedures described in previous reports (Farias et al., 2008). Briefly, U138-MG cells (4×10^3 cells/well of 96-well plate) were incubated with mangiferin (1–50 µg/ml final concentration) prepared from stocks solution of the xanthone in DMSO (1–50 mg/ml) or DMSO (1/1000 dilution, the same as in the mangiferin solutions) in a final volume of 0.2 ml for 72 h at 37 °C. Thereafter, the MTT solution (5 mg/ml) was added to each well for 4 h of incubation at 37 °C. The absorbance was read at 492 nm using a 96-well multiscanner autoreader (Bio-Rad).

2.6. Measurement of NGF levels in cell culture supernatants

After 72 h of incubation cell supernatants were collected for determination of nerve growth factor (NGF) levels using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) commercial kits according to the manufacturer's instructions (Chemicon, USA), as previously described (Farias et al., 2009). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:2 in sample diluent and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of NGF. Then, plates were washed four times with sample diluents. Monoclonal anti-NGF rabbit antibody diluted 1:1000 in sample diluent was incubated for 3 h at room temperature. After washing, a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated diluted 1:1000 for 1 h at room temperature was carried out. After addition of streptavidin-enzyme, substrate and stop solution the amount of NGF was determined for absorbance in 450 nm. The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density (OD) and NGF concentration.

2.7. Measurement of TNF- α concentration in cell culture supernatants

The amount of TNF- α in the culture supernatants after 72 h of incubation were determined using Ready-To-Go Cytokine Elisa kit (eBioscience, catalog number 88-7346) according to manufacturer protocol. Recombinant human cytokine was employed for generating a standard curve, which demonstrated a direct relationship between the log OD and the log of TNF- α concentration.

2.8. Statistics

Data for NOR are shown as mean \pm S.E.M. and were analyzed using Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann–Whitney tests when necessary. The rest of the data were analyzed with unpaired Student *t* tests. Number of animals per experimental group was ten. In all experiments, *P* values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Improving effect of mangiferin on object recognition memory

We examined the effects of post-training administration of mangiferin on consolidation of NOR memory using a training condition in which rats were exposed to two identical objects for a brief period and tested for retention at a 24 h post-training delay. Mangiferin at 10, 50, and 100 mg/kg was given immediately after training by ip. injection. There was no significant difference among groups in the total time spent exploring both objects during training: mean \pm S.E.M. time (s) spent exploring both objects were 23.7 ± 5.3 in the vehicle-treated group (Control), and 26.2 ± 4.2 , 27.6 ± 2.6 , and 19.7 ± 6.2 in the groups treated with mangiferin at 10, 50, and 100 mg/kg, respectively. Results for exploratory preferences are shown in Fig. 1A. Mangiferin enhanced 24 h NOR retention when compared to control rats. The administration of mangiferin 100 mg/kg 6 h after training did not affect NOR memory

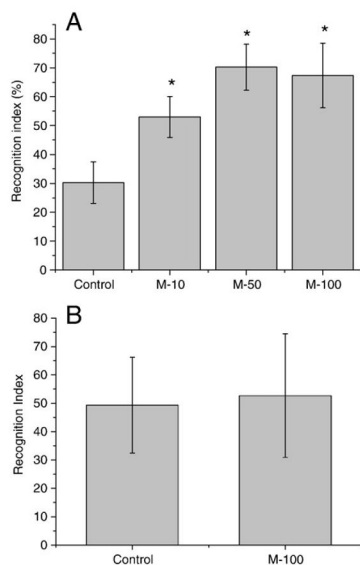


Fig. 1. Post-training ip. administration of mangiferin improves object recognition index measured 24 h (long-term memory, LTM) after training in rats. Data are expressed as median [interquartile ranges] "Recognition Index" which is defined by the ratio $T_B/(T_A + T_B)$. T_A = time spent exploring the familiar object and T_B = time spent exploring the novel object. $N = 10$ per group. A. Control (DMSO-saline 20%) or mangiferin (10, 50, or 100 mg/kg) were given immediately after training. B. Control or mangiferin (100 mg/kg) given 6 h after training. * $P < 0.05$ compared to control.

(Fig. 1B). This results indicate that mangiferin produced an improving effect on consolidation of NOR memory.

3.2. Open field behavior in rats treated with mangiferin

Statistical analysis of open field behavior in rats treated with DMSO-saline or mangiferin has shown that mangiferin did not affect the number of crossings, rearings, and latency to start locomotion or defecation (Fig. 2). These results indicate that the mangiferin-induced improvement of performance in the recognition memory task could not be attributed to alterations in sensorimotor functions such as locomotion, exploratory behavior, motivation, or anxiety.

3.3. Effects of mangiferin on U138-MG glioblastoma cell proliferation, NGF and TNF- α levels

In order to explore possible cellular mechanisms mediating the beneficial effects of mangiferin on memory, we performed *in vitro* experiments using cultured U138-MG human glioblastoma cells as an experimental model. We found that incubation with mangiferin at low (1, 2.5 and 5 μ g/ml) and high (10, 25 and 50 μ g/ml) concentrations for 72 h, significantly increased cell viability (Fig. 3AB). In addition, mangiferin induced a significant increase in the concentration of NGF and TNF- α in culture supernatant dose-dependently (Fig. 4AB).

4. Discussion

A single systemic injection of mangiferin at 10, 50, 120, or 100 mg/kg immediately after training produced an enhancement retention of a NOR task 24 h after training in rats when compared to control animals. Because animals were given post-training injection only, the observed mangiferin effects are mediated by interference on memory consolidation processes without any influence on acquisition. The absence

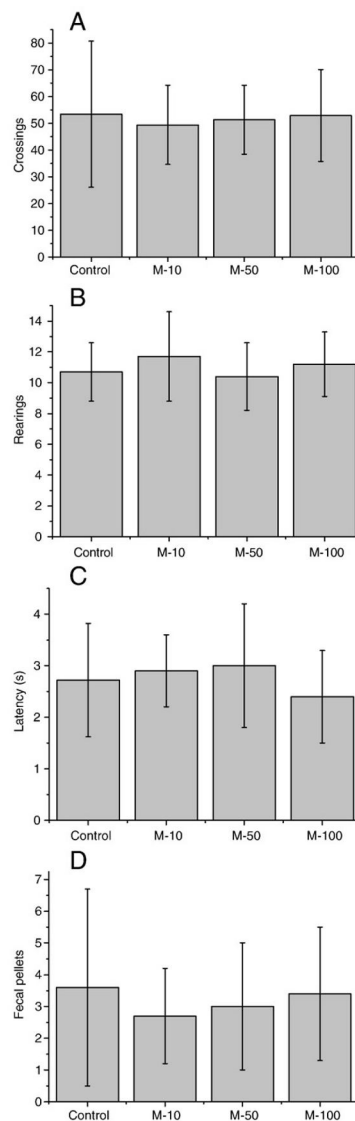


Fig. 2. Open field behavior in rats treated with an ip. administration of DMSO-saline 20% (Control) or mangiferin (10, 50, or 100 mg/kg) 24 h before behavioral testing. Animals were left to freely explore the arena for 5 min. Data are mean \pm SEM. A. Latency to start locomotion (s). B. number of crossings. C. number of rearings, and D. number of faecal pellets. There were no significant differences between groups.

of mangiferin effect on NOR memory when it was administered at 100 mg/kg, 6 h after training also support such conclusion.

Analysis of open field behavior following mangiferin treatment has demonstrated that the doses of mangiferin used (10, 50 and 100 mg/kg) in the present study has not affected general activity, thus not affecting rats' ability to explore objects. In addition, since behavioral testing was carried out 24 h after the last drug injection, the effects could not be attributed to short-lasting drug-induced alterations in behavioral performance. Since the biological half time of mangiferin ranges

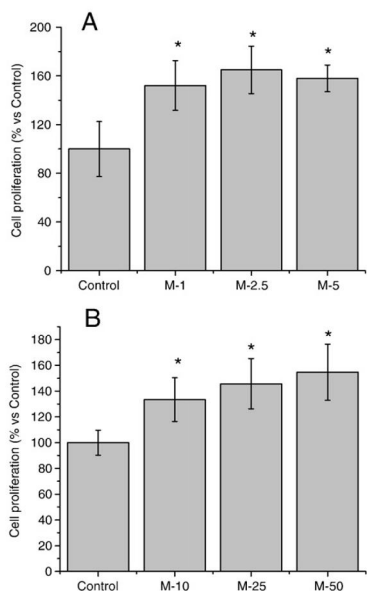


Fig. 3. Stimulatory effect of mangiferin on cell viability in U138-MG human glioblastoma cells. Experimental procedures are described in Material and Method section. U138-MG cells (4×10^3 cells/well of 96-well plate) were incubated with mangiferin at 1, 2.5 and 5 µg/ml (A) and 10, 25 and 50 µg/ml (B) in a final volume of 0.2 ml for 72 h at 37 °C. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control with DMSO.

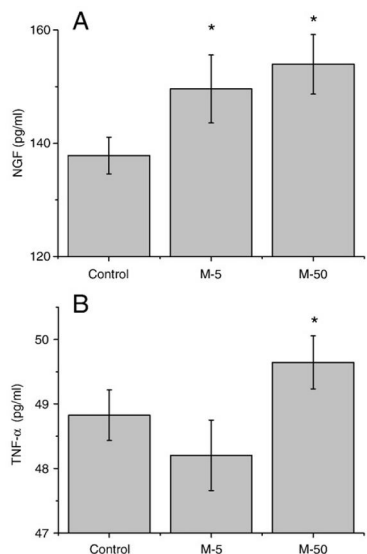


Fig. 4. Effect of mangiferin on NGF (A) and TNF- α (B) levels in U138-MG culture supernatants. After 72 h of incubation with mangiferin (5 and 50 µg/ml) or DMSO 1/1000 dilution (control) cell supernatants were collected for NGF and TNF- α determinations using commercial kits according to the manufacturer's instructions (see Materials and Method section). Data are expressed as mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control with DMSO.

between 3 and 7 h, depending on the administration route (Dai et al., 2004; Wang et al., 2006; Han et al., 2009), it is unlikely that sensorimotor or other nonspecific effects of mangiferin were involved in NOR performance tested 24 h after its administration.

There is a well documented relationship between brain levels of NGF and cognitive ability in different animal models, including recognition memory tasks (Rispoli et al., 2008; Hennigan et al., 2009; Niewiadomska et al., 2006). The above results together with a recent report showing that two prenylated xanthenes, structurally similar to mangiferin, potentiate NGF-mediated neurite outgrowth in PC12D cells (Chanmahasathien et al., 2003) prompted us to evaluate the effect of mangiferin on cellular production of NGF. Here we show for the first time that mangiferin increases the amount of NGF secreted by human glioma cells, an action that might be involved in the observed enhancing effect of mangiferin on recognition memory. In fact, in transgenic AD11 mice that exhibit a progressive Alzheimer-like neurodegeneration and memory lost, intranasal administration of NGF increased the ability of mice to remember a familiar object and associate an object to a particular context (de Rosa et al., 2005).

Neurotrophic factors promote the differentiation, survival, and functional maintenance of nerve cells. Because of these properties, they have the potential to treat a variety of chronic and acute disorders of the CNS. Although there have been some successes, clinical use of classical neurotrophic factors has been limited for technical reasons, including difficulty in crossing the blood–brain barrier. Therefore, the identification of small molecules like mangiferin, that mimic some or all of the properties of neurotrophic factors could have significant potential for treating CNS disorders.

It is unlikely that the increase in the number of cells elicited by mangiferin can explain the increased NGF levels in the cell supernatant, since we observed less cell proliferation at 50 µg/ml mangiferin than at 5 µg/ml (154 vs. 160%), but the increase in NGF levels were 7 and 11% for mangiferin at 5 and 50 µg/ml, respectively. This indicates that the increase in NGF levels cannot be attributed to the increase in cell proliferation.

Although we do not know the mechanism by which mangiferin incubation increased the U138-MG supernatant concentration of TNF- α , the increased levels of this cytokine may explain the augmented proliferation and the higher levels of NGF in U138-MG glioblastoma cells supernatant after incubation with mangiferin. In this regard, it was shown that TNF- α stimulates the synthesis and secretion of biologically active NGF in quiescent mouse and human fibroblasts and in human glioblastoma cells, as a result of the increased transcription or/and stability of the NGF mRNA (Hattori et al., 1993). Moreover, Beattie et al. (2002) demonstrated that glial-derived TNF markedly influenced synaptic efficacy by upregulating surface expression of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA) receptors, an effect mediated through TNF-R1 and phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase-dependent processes (Stellwagen et al., 2005).

Such findings support a neuromodulatory role for TNF within the brain and suggest a possible role for TNF in synaptic plasticity and possibly learning and memory.

The molecular mechanisms underlying the above mentioned mangiferin effects are unknown, but a recent study with the flavonoid fisetin, a catechol containing polyphenol structurally similar to mangiferin showed that it activated Ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade and induced cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation in rat hippocampal slices. Those effects facilitated long-term potentiation in rat hippocampal slices, and enhance object recognition in mice (Maher et al., 2006).

Further studies are required to investigate the brain systems and neurochemical mechanisms mediating the mangiferin modulation of NOR consolidation. NOR is a nonspatial memory task based on the ability to recognize a familiar object and the natural tendency to explore a novel one. Evidence indicates that brain areas involved in mediating or modulating NOR might include the dorsal hippocampus (Broadbent et

al., 2004; Clark et al., 2000; de Lima et al., 2006), the perirhinal and insular cortices (Bermudez-Rattoni et al., 2005) and, at least under some experimental conditions, the basolateral amygdala (Rozenendaal et al., 2006). It has been proposed that molecular mechanisms involved in formation of NOR memory might include N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors (de Lima et al., 2005). In addition, the adrenergic systems, and possibly peripheral release of epinephrine, modulate consolidation of object recognition memory (Dornelles et al., 2007). It is possible that mangiferin influences these and other molecular mechanisms involved in synaptic plasticity. In this regard, it has been shown that mangiferin and other related xanthenes inhibited MAO activity (Bhattacharya et al., 1972; Tomic et al., 2005) an effect that could modulate catecholamine concentrations and could partly explain its improving effect on memory.

Finally, since recognition memory dysfunctions have been associated with aging and dementias (Flicker et al., 1987; Purdy et al., 2002; Schiavetto et al., 2002) the improving ability of mangiferin on rat memory supports the view that the xanthone might be effective in treating cognitive decline associated with aging and dementia.

Acknowledgments

This work was partially supported by CAPES-Brazil/MES-Cuba (035/07). NM and GKR thanks to CAPES and CNPq, respectively, for PhD fellowships.

References

- Andreu, G.L., Delgado, R., Velho, J.A., Curti, C., Vercesi, A.E., 2005a. Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Arch. Biochem. Biophys.* 439, 184–193.
- Andreu, G.P., Delgado, R., Velho, J.A., Curti, C., Vercesi, A.E., 2005b. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. *Eur. J. Pharmacol.* 513, 47–55.
- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., Malenka, R.C., 2002. Control of synaptic strength by glial TNF alpha. *Science* 295, 2282–2285.
- Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Rozenendaal, B., McGaugh, J.L., 2005. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn. Mem.* 12, 447–449.
- Bhattacharya, S.K., Sanyal, A.K., Ghosal, S., 1972. Monoamine oxidase-inhibiting activity of mangiferin isolated from *Canscora decussata*. *Naturwissenschaften* 59, 651.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E., 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14515–14520.
- Chanmahasathien, W., Li, Y., Satake, M., Oshima, Y., Ruangrungsri, N., Ohizumi, Y., 2003. Prenylated xanthenes with NGF-potentiating activity from *Garcinia xanthochylon*. *Ptychochemistry* 64, 981–986.
- Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R., 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 8853–8860.
- Dai, R., Gao, J., Bi, K., 2004. High-performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic study of mangiferin in plasma of rats having taken the traditional Chinese medicinal preparation Zi-Shen pill. *J. Chromatogr. Sci.* 42, 88–90.
- de Lima, M.N., Luft, T., Roesler, R., Schröder, N., 2006. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci. Lett.* 405, 142–146.
- de Lima, M.N.M., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N., 2005. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 156, 139–143.
- De Rosa, R., Garcia, A.A., Braschi, C., Capsoni, S., Maffei, L., Berardi, N., Cattaneo, A., 2005. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3811–3816.
- Dornelles, A., de Lima, M.N.M., Graziotin, M., Presti-Torres, J., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Roesler, R., Schröder, N., 2007. Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88, 137–142.
- Farias, C.B., Lima, R.C., Lima, L.O., Flores, D.G., Meurer, L., Brunetto, A.L., Schwartzmann, G., Rosler, R., 2008. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* 75, 27–31.
- Farias, C.B., Stertz, L., Lima, R.C., Kapczynski, F., Schwartzmann, G., Roesler, R., 2009. Reduced NGF secretion by HT-29 human colon cancer cells treated with a GRPR antagonist. *Protein Pept. Lett.* 16, 650–652.
- Flicker, C., Ferris, S.H., Crook, T., Bartus, R.T., 1987. A visual recognition memory test for the assessment of cognitive function in aging and dementia. *Exp. Aging Res.* 13, 127–132.
- Gottlieb, M., Leal-Campanario, R., Campos Esparza, M.R., Sanchez-Gomez, M.V., Alverdi, E., Arranz, A., Delgado García, J.M., Gruart, A., Matute, C., 2006. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol. Dis.* 23, 374–386.
- Guha, S., Ghosal, S., Chattopadhyay, U., 1996. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* 42, 443–451.
- Han, D., Chen, C., Zhang, C., Zhang, Y., Tang, X., 2009. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* doi:10.1016/j.jpba.2009.07.021
- Hattori, A., Tanaka, E., Murase, K., Ishida, N., Chatani, Y., Tsujimoto, M., Hayashi, K., Kohno, M., 1993. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 268, 2577–2582.
- Hennigan, A., Callaghan, C.K., Kealy, J., Rouine, J., Kelly, A.M., 2009. Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav. Brain Res.* 197, 371–377.
- Ibarretxe, G., Sanchez-Gomez, M.V., Campos-Esparza, M.R., Alberdi, E., Matute, C., 2006. Differential oxidative stress in oligodendrocytes and neurons after excitotoxic insults and protection by natural polyphenols. *Glia* 53, 201–211.
- Ichiki, H., Miura, T., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y., Tanigawa, K., Okada, M., 1998. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 1389–1390.
- Kumar, A., Aggarwal, B.B., 1999. Assay for redox-sensitive kinases. *Methods Enzymol.* 300, 339–345.
- Leiro, J., Arranz, J.A., Yáñez, M., Ubeira, F.M., Sanmartín, M.L., Orallo, F., 2004. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int. Immunopharmacol.* 4, 763–778.
- Maher, P., Akaiishi, T., Abe, K., 2006. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15020–15025.
- Niewiadomska, G., Baksalerska-Pazera, M., Gasiorowska, A., Mietelska, A., 2006. Nerve growth factor differentially affects spatial and recognition memory in aged rats. *Neurochem. Res.* 31, 1481–1490.
- Núñez Sellés, A.J., Velez Castro, H.T., Agüero Agüero, J., Gonzalez Gonzalez, J., Naddo, F., de Simone, F., Rastrelli, L., 2002. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as nutritional supplement. *J. Agric. Food Chem.* 50, 762–766.
- Pardo-Andreu, G., Sánchez-Baldoquin, C., Ávila-González, R., Delgado, R., Naal, Z., Curti, C., 2006a. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin. *Eur. J. Pharmacol.* 547, 31–36.
- Pardo-Andreu, G.L., Barrios, M.F., Curti, C., Hernández, I., Merino, N., Lemus, Y., Martínez, I., Riaño, A., Delgado, R., 2008a. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rats serum and liver. *Pharmacol. Res.* 57, 79–86.
- Pardo-Andreu, G.L., Delgado, R., Núñez-Sellés, A.J., Vercesi, A.E., 2006b. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol. Res.* 53, 253–260.
- Pardo-Andreu, G.L., Paim, B.A., Castilho, R.F., Velho, J.A., Delgado, R., Vercesi, A.E., Oliveira, H.C., 2008b. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacol. Res.* 57, 332–338.
- Purdy, K.S., McMullen, P.A., Freedman, M., 2002. Changes to the object recognition system in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn.* 49, 213–216.
- Reolon, G.K., Braga, L.M., Camassola, M., Luft, T., Henriques, J.A., Nardi, N.B., Roesler, R., 2006. Long term memory for aversive training is impaired in *Idua^{-/-}* mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis. *Brain Res.* 1076, 225–230.
- Rispoli, V., Marra, R., Costa, N., Rotiroli, D., Tirassa, P., Scipione, L., De Vita, D., Liberatore, F., Carelli, V., 2008. Choline pivaloyl ester enhances brain expression of both nerve growth factor and high-affinity receptor TrkA, and reverses memory and cognitive deficits, in rats with excitotoxic lesion of nucleus basalis magnocellularis. *Behav. Brain Res.* 190, 22–32.
- Rozenendaal, B., Okuda, S., Van der Zee, E.A., McGaugh, J.L., 2006. Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6741–6746.
- Sarkar, A., Sreenivasan, Y., Ramesh, G.T., Manna, S.K., 2004. Beta-n-glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 33768–33781.
- Sato, T., Kawamoto, A., Tamura, A., Tatsumi, Y., Fujii, T., 1992. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthone). *Chem. Pharm. Bull.* 40, 721–724.
- Schiavetto, A., Kohler, S., Grady, C.L., Winocur, G., Moscovitch, M., 2002. Neural correlates of memory for object identity and object location: effects of aging. *Neuropsychologia* 40, 1428–1442.
- Schröder, N., O'Dell, S.J., Marshall, J.F., 2003. Neurotoxic thiamphenetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49, 89–96.
- Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., Malenka, R.C., 2005. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J. Neurosci.* 25, 3219–3228.
- Tomic, M., Tovilovic, G., Butorovic, B., Krstic, D., Jankovic, T., Aljan, I., Menkovic, N., 2005. Neuropharmacological evaluation of diethylether extract and xanthenes of *Gentiana kochiana*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 535–542.
- Wang, H., Ye, G., Tang, Y.-H., Zhu, H.-Y., Ma, R.-R., Sun, Z.-L., Huang, C.-G., 2006. High-performance liquid chromatographic method for the determination of mangiferin in rat plasma and urine. *Biomed. Chromatogr.* 20, 1304–1308.
- Zheng, M.S., Lu, Z.Y., 1990. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chin. Med. J.* 103, 160–165.

1.2 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 2

Na “short communication” intitulada “Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoxyloxanthone, on fear memory in rats”, estão reportados os efeitos da administração sistêmica de três doses de mangiferina na consolidação da memória aversiva de esquiva inibitória. Foram utilizadas as mesmas doses de mangiferina que facilitaram a consolidação da memória de longa duração (após 24h) na tarefa de reconhecimento de objeto. Este artigo foi submetido para publicação na revista “Arzneimittel-Forschung/Drug Research”.

Artigo 2

Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoxyloxanthone, on fear memory in rats

Gilberto L Pardo-Andreu^{*,1,2,3, #}, Natasha Maurmann^{*,2,3,4}, Gustavo Kellermann Reolon^{2,3,4}, Caroline Brunetto de Farias^{2,4,5}, René Delgado⁶, Rafael Roesler^{2,3,4}

* G L Pardo-Andreu and N Maurmann contributed equally to this work.

¹ *Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Cuba*

² *Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE/HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil*

³ *Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil*

⁴ *National Institute for Translational Medicine (INCT-TM). Brazil*

⁵ *Children's Cancer Institute (ICI-RS) and Pediatric Oncology Service. Porto Alegre, RS, Brazil*

⁶ *Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Habana, Cuba*

Correspondence to: Gilberto Lázaro Pardo-Andreu. Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, ave. 23 # 21425 e/ 214 and 222, La Coronela, La Lisa. CP 13600, Ciudad Habana (Cuba); Fax: +53 7 2736811, Phone: +53 7 2719531 E-mail address: gilbertopardo@infomed.sld.cu (G.L. Pardo-Andreu)

Running title

Mangiferin impairs fear memory in rats

Keywords:

mangiferin – memory – inhibitory avoidance

Abstract

Mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxy-2-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]xanthen-9-one), one of the xanthone derivatives, and C-glucosylxanthenones is widely distributed in higher plants and is one of the constituents of folk medicine. In the present study the effect of systemic administration of mangiferin on behavioural outcomes of neurological function in normal rats was investigated. A single i.p. (intraperitoneal) injection of mangiferin (10, 50 and 100mg/kg body weight) immediately post-training produced an impairment of long-term memory for aversive training and a reduced freezing in a dose independent manner, when given immediately post-training. The administration of mangiferin 6h post-training did not affect fear memory. The results indicate that mangiferin might induce deficits of emotionally motivated memory.

Introduction

Mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxy-2-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]xanthen-9-one) was originally isolated from *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). It was distributed among at least sixteen plant families, including Anacardiaceae, Iridaceae and Gentianaceae (POLYA, 2003).

Studies *in vitro* have shown that mangiferin has antiviral activity against herpes simplex virus (ZHENG e LU, 1990), as well as antioxidant (SATO *et al.*, 1992; PARDO-ANDREU *et al.*, 2005a; 2005b; 2006a; 2006b) and anti-HIV activity (GUHA *et al.*, 1996). Mangiferin orally administered to rats or mice exerts biological antitumor (GUHA *et al.*, 1996), antidiabetic (ICHIKI *et al.*, 1998), antioxidant (PARDO-ANDREU *et al.*, 2008a; 2008b) and immunomodulative (LEIRO *et al.*, 2004) activities. Most of the effects mentioned above are explained partly by the xanthone ability to inhibit NF- κ B activation (LEIRO *et al.*, 2004; SARKAR *et al.*, 2004).

Given the several biological actions of mangiferin and its potential as a therapeutic agent, it is important to investigate its possible effects on the central nervous system. Evaluating neurological function on rodents might reveal potential novel therapeutic and/or neurotoxic effects of mangiferin. Therefore, we evaluate the effects of systemic administration of mangiferin on aversive memory.

Materials and Methods

Reagents

Mangiferin (95% purity) was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Animals and drug administration

Male Wistar rats were obtained from the State Foundation for Health Science Research (FEPPS-RS, Porto Alegre, RS, Brazil). The animals were maintained in groups of five, in a plastic cage with sawdust bedding, in a room temperature of $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ and a 12h light/dark cycle, and were supplied with standardized food pellet and tap water *ad libitum*. All behavioural experiments took place between 9 a.m. and 5 p.m. The animals were randomly divided into four groups of ten animals each: control group, which received ip. injection of mangiferin vehicle (20% DMSO in saline solution), M-10, M-50 and M-100 groups, which that received ip. injection of mangiferin 10, 50 and 100mg/kg body weight, respectively. The injections (1ml/kg) took place immediately after training. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

Inhibitory avoidance

The inhibitory avoidance (IA) conditioning is a well established model of emotionally motivated memory in rats (MCGAUGH, 2000) that can be used in the characterization of cognitive deficits in rodent models of neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders (REOLON *et al.*, 2006). The IA apparatus was a 50x25x25cm acrylic box whose floor consisted of parallel stainless steel bars (1mm diameter) spaced 1cm apart. A 7cm wide, 5cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. Animals were put on the platform and their latency to step-down on the grid with all four paws was recorded. In training sessions, immediately after stepping down on the grid, the animals were given a 0.6mA, 1.0s

foot shock. On the retention tests sessions carried out 24h or 7 days after training (long-term memory), no foot shock was given, and the step-down latency was used as a measure of retention, as previously described (ROESLER *et al.*, 2004; MAURMANN *et al.*, 2010). A ceiling of 300s was used on tests, and during the 24h test was measured the time of freezing, another fear response.

Statistics

Data are shown as mean (interquartile ranges), and were analyzed using Kruskal-Wallis analysis of variance, followed by Mann-Whitney tests when necessary. Number of animals per experimental group was ten. *P* values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Figure 1 shows the training performance of the experimental groups and the long-term (24h) retention of inhibitory avoidance in rats given an i.p. injection of vehicle or mangiferin (10, 50 or 100mg/kg) immediately after training. There were no significant differences among groups in training trial performances. Mangiferin at all tested doses impaired the long-term retention test performance, eliciting around 80-90% of inhibition when compared to control (Figure 1A). Mangiferin also reduced significantly the time of freezing (Figure 1B), a typical conditioned fear response.

When retrained and retested drug-free 1 week after the first training, animals previously treated with mangiferin and tested for 24h retention showed normal inhibitory avoidance learning ability (data not shown), indicating that the impairing effect of mangiferin could not be attributed to an irreversible impairing effect or permanent neuronal damage. When injected 6h after training, mangiferin at the memory-impairing dose of 100mg/kg had no effect on long-term memory of inhibitory avoidance (Figure 1C). The results indicate that mangiferin produced an impairing effect on consolidation of memory for aversively-motivated training.

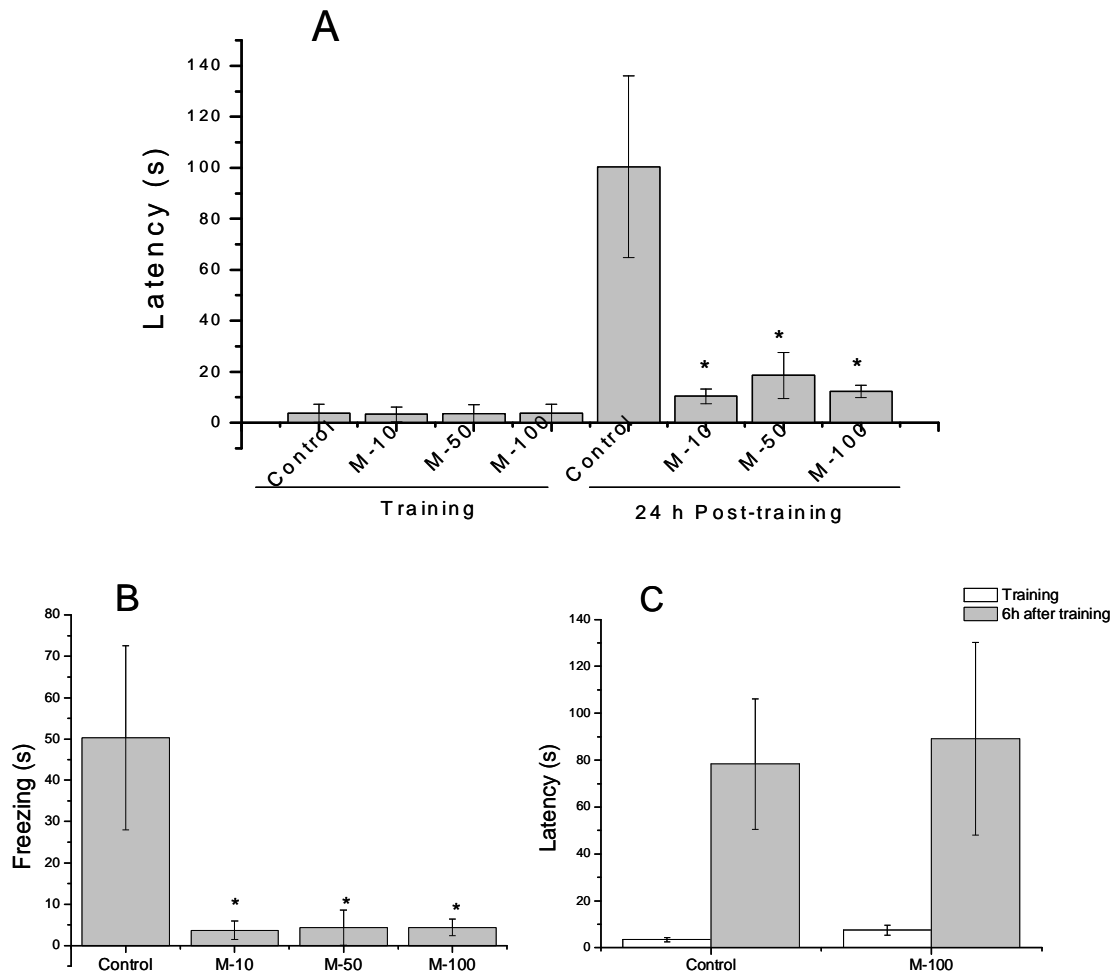


Figure 1: Post-training intraperitoneal administration of mangiferin impairs retention of inhibitory avoidance (IA) conditioning measured 24h (long-term memory, LTM) after training in rats. Training performances were similar among groups. Data are median (interquartile ranges) retention test latencies to step down. A) Control (20% DMSO in saline) or mangiferin (10, 50, or 100mg/kg) were given immediately after IA training. B) Freezing movements of Control (20% DMSO in saline) or mangiferin (10, 50, or 100mg/kg) given immediately after IA training. C) Control (20% DMSO in saline) or mangiferin (100 mg/kg) were given 6h after IA training. * $P < 0.05$ compared to Controls

In a previous work, we analysed non-aversive memory, locomotion and exploratory behaviour in rats. Analysis of open-field behaviour in rats treated with vehicle or mangiferin showed that mangiferin did not affect the latency to start locomotion, number of crossings, rearings or defecation (PARDO-ANDREU *et al.*, 2010). These results indicated that the mangiferin-induced deficit of performance in the inhibitory avoidance task could not be attributed to alterations in sensorimotor functions, such as locomotion, exploratory behaviour or motivation.

Discussion

A single systemic injection of mangiferin at 10, 50 or 100mg/kg immediately after training produced an impairment of long-term memory for aversive training and a reduction of freezing in a dose independent manner. For animals were given post-training injection only, the observed mangiferin effects are mediated by interference on memory consolidation processes without any influence on acquisition. The absence of mangiferin effect on aversive memory when it was administered at 100mg/kg, 6h after training, also supports such conclusion.

Analysis of open-field behavior following mangiferin treatment has demonstrated that the doses of mangiferin used (10, 50 and 100mg/kg) have not affected general activity in a previous study (PARDO-ANDREU *et al.*, 2010), thus, not affecting rats' locomotion and exploratory behaviour. In addition, since behavioral testing was carried out 24h after the drug injection, the effects could not be attributed to short-lasting drug-induced alterations in behavioral performance. Since the biological half time of mangiferin ranges between 3 and 7h, depending on the administration route (DAI *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2006), it is unlikely that sensorimotor or other non-specific effects of mangiferin were involved in IA performance tested 24h after its administration.

Clinical interventions with the mangiferin-enriched extract Vimang on AIDS patients or elderly persons did not produce visible evidences of neurological deterioration, even after 2-6 months of daily treatment (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007). Indeed, we have recently shown that a single oral administration of the extract mentioned above in rats produced an impairment of short and long-term retention of memory for aversive training when given either 1h pre-training or immediately post-training, but not 8h post-training (PREISLER *et al.*, 2009).

It was also recently shown that mangiferin (20mg/kg, p.o.) significantly reversed scopolamine-induced deficits in the passive avoidance test (JUNG *et al.*, 2009), probably throughout an antagonistic effect against scopolamine, a well-known anti-cholinergic agent. Nevertheless, NF- κ B is known to be important in learning and memory (KALTSCHMIDT and KALTSCHMIDT, 2009). Inhibition of NF- κ B immediately after IA training impaired long-term memory in mice (FREUDENTHAL *et*

al., 2005). It is possible that mangiferin reversed scopolamine-induced deficits through an inhibition of acetylcholinesterase (JUNG *et al.*, 2009) and impaired memory through NF- κ B inhibition in the physiological conditions of our experiments. A number of mechanisms, including N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors, protein synthesis, protein kinase A (PKA) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the dorsal hippocampus and other brain areas (QUEVEDO *et al.*, 2004; ROESLER *et al.*, 2003) are important for long-term memory of IA. It is possible that mangiferin influences these and other molecular mechanisms involved in synaptic plasticity. Indeed, mangiferin was shown to attenuate RANKL-induced ERK phosphorylation in RAW264.7 cells (ANG *et al.*, 2010). Therefore, further experiments are required to clarify the mechanisms underlying the impairing effect of mangiferin on aversive memory.

It was suggested elsewhere the inability of mangiferin to cross the blood brain barrier, since the xanthone was undetectable in brain dialysate after its administration via the femoral vein to rats (LAI *et al.*, 2003). The limit of quantification for mangiferin in the above mentioned reports was established at 0.05 μ g/ml, which is equivalent to 100nM mangiferin, approximately. Curiously, it was observed that mangiferin in the range between 1 and 10nM was able to prevent more than 25% of the deaths of cortical neurons induced by glutamate *in vitro* (GOTTLIEB *et al.*, 2006). Thus, it is plausible that mangiferin reaches brain parenchyma and has neurobehavioural effect at very low concentrations, as previously described.

Together, the data suggest that systemic administration of mangiferin might produce deficits in emotionally-motivated memory.

Acknowledgments

Natasha Maurmann thanks Coordination for the Improvement Higher Education Personnel (CAPES), and Gustavo Kellermann Reolon thanks National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) for PhD fellowships. Caroline Brunetto de Farias thanks the Children's Cancer Institute. This work was partially supported by CAPES, Brazil/Ministerio de Educación Superior, Cuba (CAPES/MES Cuba 035/07).

References

- ANG, E.; LIU, Q.; QI, M.; LIU, H. G.; YANG, X.; CHEN, H.; ZHENG, M. H.; XU, J. Mangiferin attenuates osteoclastogenesis, bone resorption and RANKL-induced activation of NF- κ B and ERK. *J Cell Biochem* [S.I.], v. 112, n. 1, p. 89-97, Jan 2010.
- DAI, R.; GAO, J.; BI, K. High-performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic study of mangiferin in plasma of rats having taken the traditional Chinese medicinal preparation Zi-Shen pill. *J Chromatogr Sci* [S.I.], v. 42, n. 2, p. 88-90, Feb 2004.
- FREUDENTHAL, R.; BOCCIA, M. M.; ACOSTA, G. B.; BLAKE, M. G.; MERLO, E.; BARATTI, C. M.; ROMANO, A. NF- κ B transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 21, n. 10, p. 2845-52, May 2005.
- GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; ALBERDI, E.; ARRANZ, A.; DELGADO-GARCIA, J. M.; GRART, A.; MATUTE, C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 374-86, Aug 2006.
- GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 443-51, Nov-Dec 1996.
- HAN, D.; CHEN, C.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; TANG, X. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* [S.I.], v. 51, n. 1, p. 260-3, Jan 2010.
- ICHIKI, H.; MIURA, T.; KUBO, M.; ISHIHARA, E.; KOMATSU, Y.; TANIGAWA, K.; OKADA, M. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol Pharm Bull* [S.I.], v. 21, n. 12, p. 1389-90, Dec 1998.
- JUNG, K.; LEE, B.; HAN, S. J.; RYU, J. H.; KIM, D. H. Mangiferin ameliorates scopolamine-induced learning deficits in mice. *Biol Pharm Bull* [S.I.], v. 32, n. 2, p. 242-6, Feb 2009.
- KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. NF- κ B in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [S.I.], v. 1, n. 3, p. a001271, Sep 2009.
- LAI, L.; LIN, L. C.; LIN, J. H.; TSAI, T. H. Pharmacokinetic study of free mangiferin in rats by microdialysis coupled with microbore high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* [S.I.], v. 987, n. 1-2, p. 367-74, Feb 2003.
- LEIRO, J.; ARRANZ, J. A.; YÁÑEZ, M.; UBEIRA, F. M.; SANMARTÍN, M. L.; ORALLO, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor- κ B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int Immunopharmacol* [S.I.], v. 4, n. 6, p. 763-78, Jun 2004.

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G.; ROESLER, R. A Valepotriate Fraction of *Valeriana glechomifolia* Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], Jan 2010.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science* [S.I.], v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 2000.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; GARRIDO, G. G.; GARCIA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCIA, M.; PARDO-ANDREU, G. L. The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 351-8, May 2007.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; VELHO, J. A.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 439, p. 184-93, Jul 2005a.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; VELHO, J. A.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 513, n. 1-2, p. 47-55, Apr 2005b.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VERCESI, A. E. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 53, n. 3, p. 253-60, Mar 2006a.

PARDO-ANDREU, G. L.; SÁNCHEZ-BALDOQUÍN, C.; ÁVILA-GONZÁLEZ, R.; DELGADO, R.; NAAL, Z.; CURTI, C. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 547, n. 1-3, p. 31-6, Oct 2006b.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M. F.; CURTI, C.; HERNÁNDEZ, I.; MERINO, N.; LEMUS, Y.; MARTÍNEZ, I.; RIAÑO, A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 79-86, Jan 2008a.

PARDO-ANDREU, G. L.; PAIM, B. A.; CASTILHO, R. F.; VELHO, J. A.; DELGADO, R.; VERCESI, A. E.; OLIVEIRA, H. C. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 57, n. 5, p. 332-8, May 2008.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. R.; FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 635, n. 1-3, p. 124-8, Jun 2010.

POLYA, G. *Biochemical Targets of Plant Bioactive Compounds: A Pharmacological Reference Guide to Sites of Action and Biological Effects*. 1.ed. Hardcover, Taylor and Francis Publishers, p. 651, 2003.

PREISSLER, T.; MARTINS, M. R.; PARDO-ANDREU, G. L.; HENRIQUES, J. A.; QUEVEDO, J.; DELGADO, R.; ROESLER, R. *Mangifera indica* extract (Vimang) impairs aversive memory without affecting open field behaviour or habituation in rats. *Phytother Res* [S.I.], v. 23, n. 6, p. 859-62, Jun 2009.

QUEVEDO, J.; VIANNA, M. R.; MARTINS, M. R.; BARICHELO, T.; MEDINA, J. H.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 154, n. 2, p. 339-43, Oct 2004.

REOLON, G. K.; BRAGA, L. M.; CAMASSOLA, M.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A. P.; NARDI, N. B.; ROESLER, R. Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua(-/-)* mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain Res* [S.I.], v. 1076, n. 1, p. 225-30, Mar 2006.

ROESLER, R.; KOPSCHINA, M. I.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A.; SOUZA, D. O.; SCHWARTSMANN, G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 486, n. 1, p. 35-41, Feb 2004.

ROESLER, R.; SCHRODER, N.; VIANNA, M. R.; QUEVEDO, J.; BROMBERG, E.; KAPCZINSKI, F.; FERREIRA, M. B. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res* [S.I.], v. 975, n. 1-2, p. 207-13, Jun 2003.

SARKAR, A. ; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G. T.; MANNA, S. K. Beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 32, p. 33768-81, Aug 2004.

SATO, T.; KAWAMOTO, A.; TAMURA, A.; TATSUMI, Y.; FUJII, T. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). *Chem Pharm Bull* [S.I.], v. 40, n. 3, p. 721-4, Mar 1992.

WANG, H.; YE, G.; TANG, Y. H.; ZHU, H. Y.; MA, R. R.; SUN, Z. L.; HUANG, C. G. High-performance liquid chromatographic method for the determination of mangiferin in rat plasma and urine. *Biomed Chromatogr* [S.I.], v. 20, n. 12, p. 1304-8, Dec 2006.

ZHENG, M. S.; LU, Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chin Med J* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 160-5, Feb 1990.

1.3 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 3

Dando continuidade aos dois artigos anteriores, onde foram estudados os efeitos de administrações sistêmicas de mangiferina na memória, na tarefa de reconhecimento de objeto e na tarefa de esQUIVA inibitória, neste artigo pesquisamos se essas atividades biológicas comportamentais, em ratos, são mediadas pelas estruturas cerebrais hipocampo e amígdala.

Utilizamos a técnica da cirurgia estereotáxica, a qual permite o implante de cânulas-guia de orientação para a introdução precisa das moléculas estudadas em regiões específicas do cérebro (GEIGER *et al.*, 2008).

Neste artigo foram realizados os mesmos testes comportamentais descritos nos dois artigos anteriores (PARDO-ANDREU *et al.*, 2010a; 2010b), e com a utilização de cirurgia estereotáxica, foram implantadas cânulas no complexo basolateral da amígdala (BLA) (Figura 1.3.1) ou hipocampo (Figura 1.3.2) de ratos Wistar para a infusão de mangiferina nessas duas estruturas.

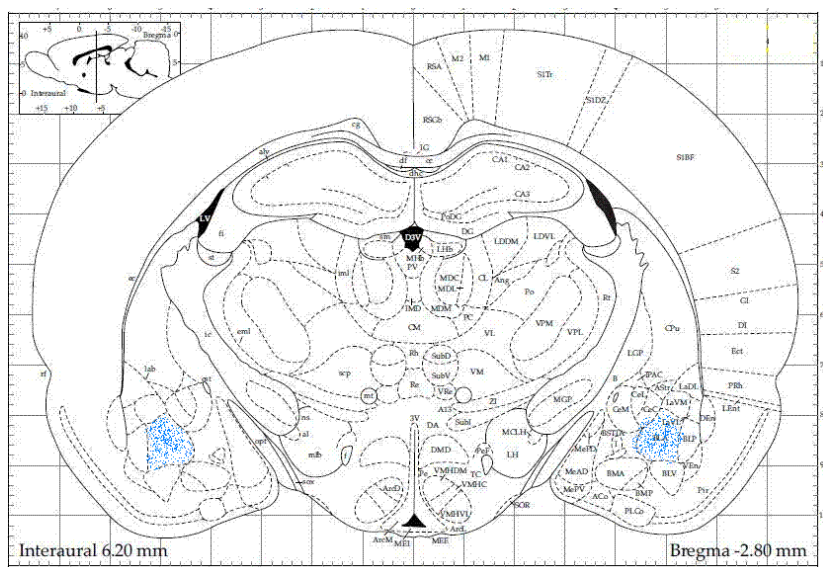


Figura 1.3.1: Diagrama do corte histológico, com o complexo basolateral da amígdala marcado em azul indicando os locais das infusões. Coordenadas: 2,8mm ântero-posterior ao bregma; 4,8mm mediolateral ao bregma e 7,5mm ventral a superfície do crânio. Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson, 1998

Artigo 3**Mangiferin reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory in rats**

Natasha Maurmann^{1,2}, Samira Valvassori^{2,3}, Aline Werenicz^{1,2}, Thiago Rodrigues Pedroso^{1,2}, Paulo Fernandes Costa Jobim^{1,2}, João Luciano de Quevedo^{2,3}, Rafael Roesler^{1,2}

¹*Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil*

²*National Institute for Translational Medicine (INCT-TM). Brazil*

³*Laboratory of Neurosciences, Postgraduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina. Criciúma, Brazil*

Abstract

Previous studies have shown that intraperitoneal administration of mangiferin facilitated the memory of novel object recognition (NOR) and impaired retention of an inhibitory avoidance test (IA) in rats. The aim of this study is to investigate whether the hippocampus and the amygdala are involved, facilitating the memory induced by mangiferin in the test of NOR and the memory impairment in IA test. Male Wistar rats received bilateral infusion of mangiferin at 10µg (Mang, 10µg) into the basolateral amygdala (BLA) or into the dorsal hippocampus immediately after NOR or IA training. Control animals received the vehicle in which the drugs were dissolved (10% DMSO in saline). The intrahippocampal infusion, but not the intra-BLA infusion of mangiferin improved object recognition memory. In the inhibitory avoidance task, both the rats treated with vehicle or mangiferin showed learning after intra-BLA and after intrahippocampal infusions (comparison between training and test), but there were not differences between control and animals treated with mangiferin during training or testing. The memory improvement in NOR observed in systemic administration of mangiferin was also observed with intrahippocampal infusion, but not in the intra-BLA infusion. The memory impairment observed in the systemically IA test was not seen

in the hippocampus or amygdala infusion and may be mediated by other brain region, such as the entorhinal cortex, insular cortex, or neocortical areas.

Keywords:

mangiferin – hippocampus – Basolateral amygdala (BLA) – memory consolidation – novel object recognition – inhibitory avoidance – long term memory (LTM)

Introduction

The most reported xanthone in angiosperms is the C-glycoside mangiferin (EL-SEEDI *et al.*, 2009). This polyphenol presents pharmacological activities in several experimental models, and it has been calling the attention for its protective function against oxidative injury to various tissues, including the brain (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; MURUGANANDAN *et al.*, 2002; GARRIDO *et al.*, 2004; MURUGANANDAN *et al.*, 2005; GARRIDO *et al.*, 2006; BHATIA *et al.*, 2008).

Intraperitoneal administration of mangiferin shows improved long-term novel object recognition (NOR) memory (PARDO-ANDREU *et al.*, 2010a) and impaired retention of an inhibitory avoidance test (IA) (PARDO-ANDREU *et al.*, 2010b) in rats.

Converging evidence from anatomical, electrophysiological and lesion studies suggests that two distinct temporal lobe structures, the amygdala and the hippocampus, play an important role in learning and memory (MOSES *et al.*, 2005).

The hippocampus is part of the limbic system, located in the medial temporal lobe. It plays an important role in the formation of new memories, particularly declarative memory involving spatial or contextual information. The basolateral amygdala (BLA) comprises the basal, lateral and accessory basal nuclei of the amygdala. Extensive evidence indicates that the BLA is the portion of the amygdala which is critical in mediating modulatory influences on memory consolidation (ROESLER and MCGAUGH, 2010).

In order to further evaluate if the systemic effect of mangiferin administration in memory formation of object recognition and inhibitory avoidance is mediated by BLA or hippocampal infusions, the current study examined the effects of

infusions of mangiferin into the BLA or dorsal hippocampus on memory consolidation in these two tasks (NOR and IA).

Methods

Animals

Adult male Wistar rats from the CREAL/UFRGS (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – Universidade Federal do Rio Grande do Sul) were housed five to a cage in a temperature-controlled colony room with food and water available *ad libitum*, and maintained on a 12h light/dark cycle (lights on at 08 a.m.). Behavioral procedures were conducted during the light phase of the cycle, between 10 a.m. and 5 p.m. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication N° 80-23 revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering. (Research ethics committee number N17903).

Implantation of cannulae

The surgery was adapted as previously described (ROESLER *et al.*, 2000; ROESLER *et al.*, 2006). Briefly, the rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (75mg/kg) and xylazine (15mg/kg). Stainless steel cannulae (22gauge) were stereotactically implanted bilaterally into the BLA (2.8mm anteroposterior to bregma, 4.8mm mediolateral from bregma, and 7.5mm ventral from skull surface) or bilaterally into the CA1 area of the dorsal hippocampus (4.3mm anteroposterior to bregma, 3.0mm mediolateral from bregma, and 1.4mm from ventral from skull surface) (PAXINOS and WATSON, 1986). After surgery, rats were returned to their home cages for a 7 days recovery period before undergoing behavioral experiments.

Behavioral training

We used the single-trial step-down Inhibitory Avoidance (IA) conditioning and Novel Object Recognition (NOR).

Novel object recognition memory (NOR)

The NOR procedure uses the natural preference for novel objects displayed by rats and mice (STECKLER *et al.*, 1998). Animals were trained and tested in a NOR task, as previously described (MAURMANN *et al.*, 2010; PARDO-ANDREU *et al.*, 2010a). NOR training took place in the open-field arena (45x40x50cm), in a floor covered with sawdust. During the habituation session, the animals were allowed to explore the empty open-field arena for 2min. Training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (two long neck glass bottles of 255ml each or two metal cans of 700ml each) were positioned in two adjacent corners, 9cm from the walls. Animals were allowed to explore the objects for 5min. In a long-term memory test given 24h after training (LTM), the rats explored the open-field for 5min. in the presence of one familiar and one novel object. In each experimental group, half the animals were trained with two cans, and the bottle was the novel object; the other half was trained with two bottles, and the can was the novel object. The animals showed no exploratory preference for the bottle or the can ($P=0.69$). The NOR retention test required that the rats recalled which of the two objects they had been previously familiarized with. A recognition index calculated for each animal was expressed by the percentage $T_n/(T_f+T_n)*100$ [T_n =time spent exploring the novel object; T_f =time spent exploring the familiar object]. Between trials, the objects were washed with 10% ethanol solution. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or the forepaws. Sitting on the object was not considered exploration.

Inhibitory avoidance (IA)

In IA training, animals learn how to associate a location in the training apparatus with an aversive stimulus (footshock). The IA behavioral training and retention test procedures were described in previous reports (ROESLER *et al.*, 2006; MAURMANN *et al.*, 2010; PARDO-ANDREU *et al.*, 2010b). The IA apparatus was a 50x25x25cm acrylic box (Albarsch®, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1mm diameter) spaced 1cm apart. A 10cm wide, 5cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step down on the

grid with all four paws was measured. Immediately after stepping down on the grid, rats received a pulsed footshock of 0.7mA for 3s and were removed from the apparatus immediately after the footshock. A retention test was carried out 24h after training (LTM). The retention test trial was procedurally identical to training, except that no footshock was presented. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 180s) were used as a measure of IA retention.

Drugs and infusion procedures

Intra-BLA or intrahippocampal infusion procedures have been described in previous reports (ROESLER *et al.*, 2004; ROESLER *et al.*, 2006). At the time of the infusion, a 27gauge infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0mm beyond the guide cannula and was aimed at the BLA or CA1 area of the dorsal hippocampus. Drugs injections of 0.5 μ l (BLA) or 1.0 μ l (hippocampus) were performed during 1min. period. After the infusion of drug or vehicle, the infusion needle was left in place for an additional minute to allow the diffusion of the drug away from the needle tip. Initially, mangiferin (1, 5, or 10 μ g/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in the vehicle (control=10% dimethylsulfoxide in saline) in the IA (hippocampus infusion) was tested. There were not differences between the treatments (data not showed). Mangiferin at 10 μ g/ml was chosen and infused bilaterally into the BLA or hippocampus, immediately after NOR or IA training. Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

Histology

Twenty-four to 72h after behavioral testing, the animals were killed by decapitation. Their brains were removed, stored in 10% formalin for at least 72h and verified for infusion site placements as follows: 1% methylene blue solution was infused as described above, and the extension of the dye was taken as an indicative of diffusion of drugs previously given to each rat (ROESLER *et al.*, 2004; ROESLER *et al.*, 2006). Only data from animals with correct infusion sites were included in the final analysis.

Statistics

Data are mean + SEM of retention test latencies to step-down (seconds) in the IA or percentage of the exploration time in the NOR. Comparisons between training and LTM among groups were made using Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney U-tests, when necessary; comparisons between training and test sessions were made with a Wilcoxon test (MAURMANN *et al.*, 2010). In all comparisons, *P* values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. The number of animals per experimental group was at least eight. Statistical analysis was performed using the statistical software package SPSS.

Results and discussion

Novel object recognition memory consolidation

We examined the effects of post-training intra-BLA or intrahippocampal infusions of mangiferin on consolidation of NOR memory using a training condition in which rats were exposed to two identical objects for a brief period and tested for retention at a 24h post-training delay (LTM). Mangiferin at 10 μ g/BLA or 10 μ g/hippocampus was given immediately after training.

Novel object recognition memory consolidation in the BLA

Results for percentage of exploratory preferences are shown in Figure 1A. There was not any significant difference among groups in the whole time spent exploring both objects during training: mean \pm S.E.M. time (s) spent exploring both objects were 39.8 \pm 1.2 in the group treated with vehicle (Control), and 44.5 \pm 4.6 in the group treated with mangiferin (10 μ g/BLA) (*P*=0.48). There were not significant differences in the percentage of the exploration time exploring familiar objects among groups, either during training trial (*P*=0.18) or during test (*P*=1.00) (Figure 1A). The controls and mangiferin-treated animals showed learning (significant training-LTM differences in the Wilcoxon test, *P*s \leq 0.05).

Novel object recognition memory consolidation in the Hippocampus

Results for exploratory preferences (%) are shown in Figure 1B. There was not any significant difference among groups in the total time spent exploring both objects during training: mean \pm S.E.M. time (s) spent exploring both objects were 59.5 ± 2.9 in the control, and 43.8 ± 3.2 in the mangiferin-treated ($10 \mu\text{g}/\text{BLA}$) ($P=0.54$) animals. There was not significant difference in the percentage of the exploration time exploring both objects among groups during training trial ($P=0.28$), but there was a significant difference in the percentage of the exploration time exploring both objects among groups during test ($P=0.01$), indicating that mangiferin enhanced LTM NOR retention when compared to control rats. Control animals did not show learning ($P=0.58$, training-LTM differences in the Wilcoxon test), and mangiferin-treated animals showed learning ($P=0.02$, training-LTM differences in the Wilcoxon test).

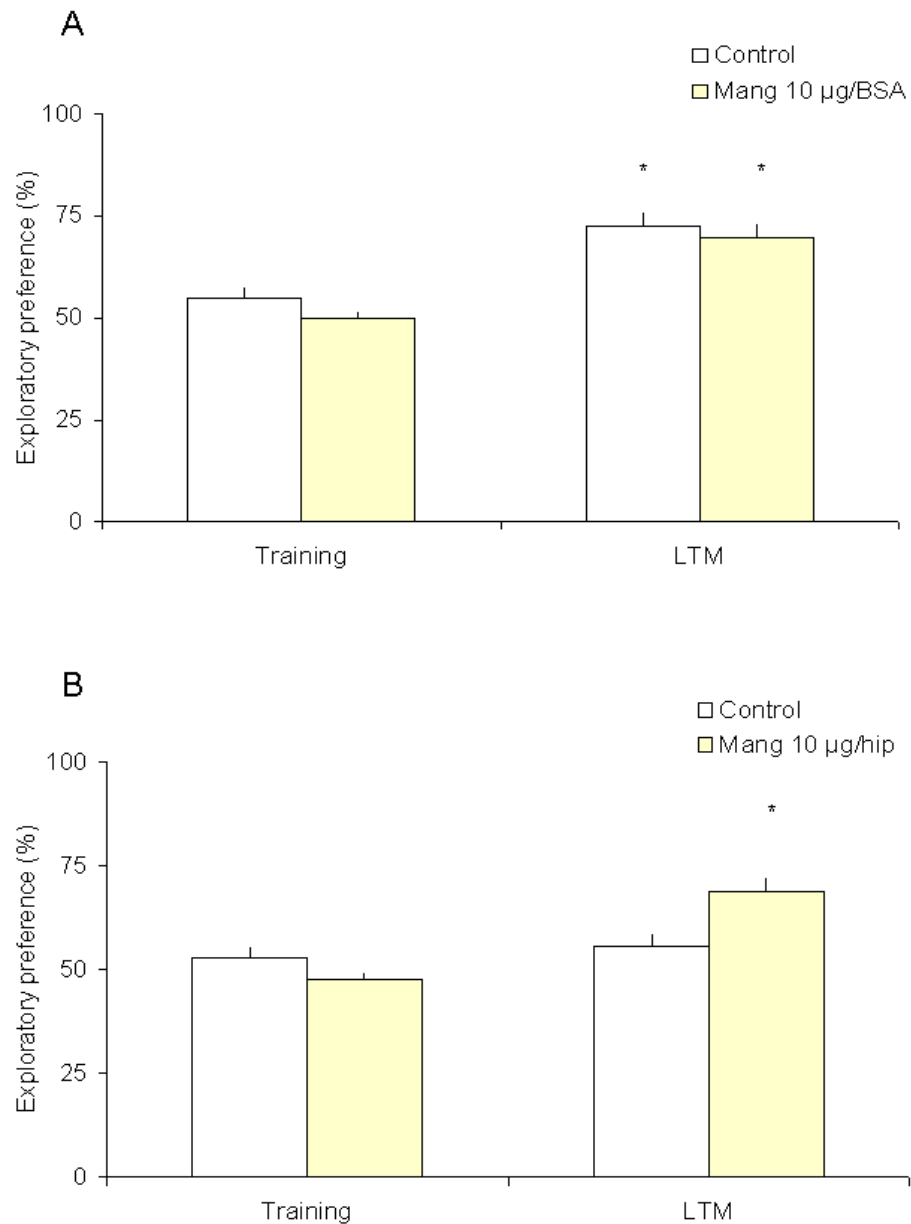


Figure 1: Post-training intrahippocampal infusion of mangiferin improves novel object recognition percentage measured 24h (long-term memory, LTM) after training in rats. Data are expressed as mean + SEM “Exploratory preference (%)” in (A) intra-BLA (n=6 per group) and (B) intrahippocampal (n=8 per group) infusions. Control (DMSO/saline 10%) or mangiferin (10µg) were given immediately after training. Asterisks indicate groups showing significant training-test differences (Wilcoxon test, $P_s \leq 0.05$)

These results indicate that intrahippocampal mangiferin infusion produced an improving effect on consolidation of NOR memory. Intrahippocampal control animals did not show learning and BLA control animals showed learning. It is possible that micro-infusion of DMSO in the hippocampus is detrimental to memory, resulting in the absence of learning in animals treated with vehicle, an effect reversed

by mangiferin. Other studies revealed an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory (LIMA *et al.*, 2006).

Inhibitory avoidance memory consolidation

We examined the effects of post-training intra-BLA or intrahippocampal infusions of mangiferin on consolidation of IA memory using a training condition in which rats were exposed to aversive stimulus (footshock) and tested for retention at a 24h post-training delay (LTM). Mangiferin at 10 μ g/BLA or 10 μ g/hippocampus was given immediately after training.

Inhibitory avoidance memory consolidation in the BLA

Results for mangiferin BLA infusion in the IA task are shown in Figure 2A. In all groups, there were significant training-test differences (Wilcoxon test, $P_s \leq 0.001$). There were not significant differences (Kruskal-Wallis test) among groups in step-down latencies in the training trial ($P=0.74$). In addition, there was not a significant difference between groups in long-term memory retention carried out 24h after training ($P=0.96$). The results indicate that mangiferin intra-BLA infusion did not affect inhibitory avoidance memory.

Inhibitory avoidance memory consolidation in the hippocampus

All groups showed learning (Wilcoxon test, $P_s \leq 0.001$). Mangiferin infused in the dorsal hippocampus did not induce a significant difference of IA memory retention (Figure 2B). There were not significant differences (Kruskal-Wallis test) among groups in step-down latencies in the training trial ($P=0.59$). In addition, there was not any significant difference between groups in long-term memory retention carried out 24h after training ($P=0.76$). The results indicate that mangiferin intrahippocampal infusion did not affect inhibitory avoidance memory.

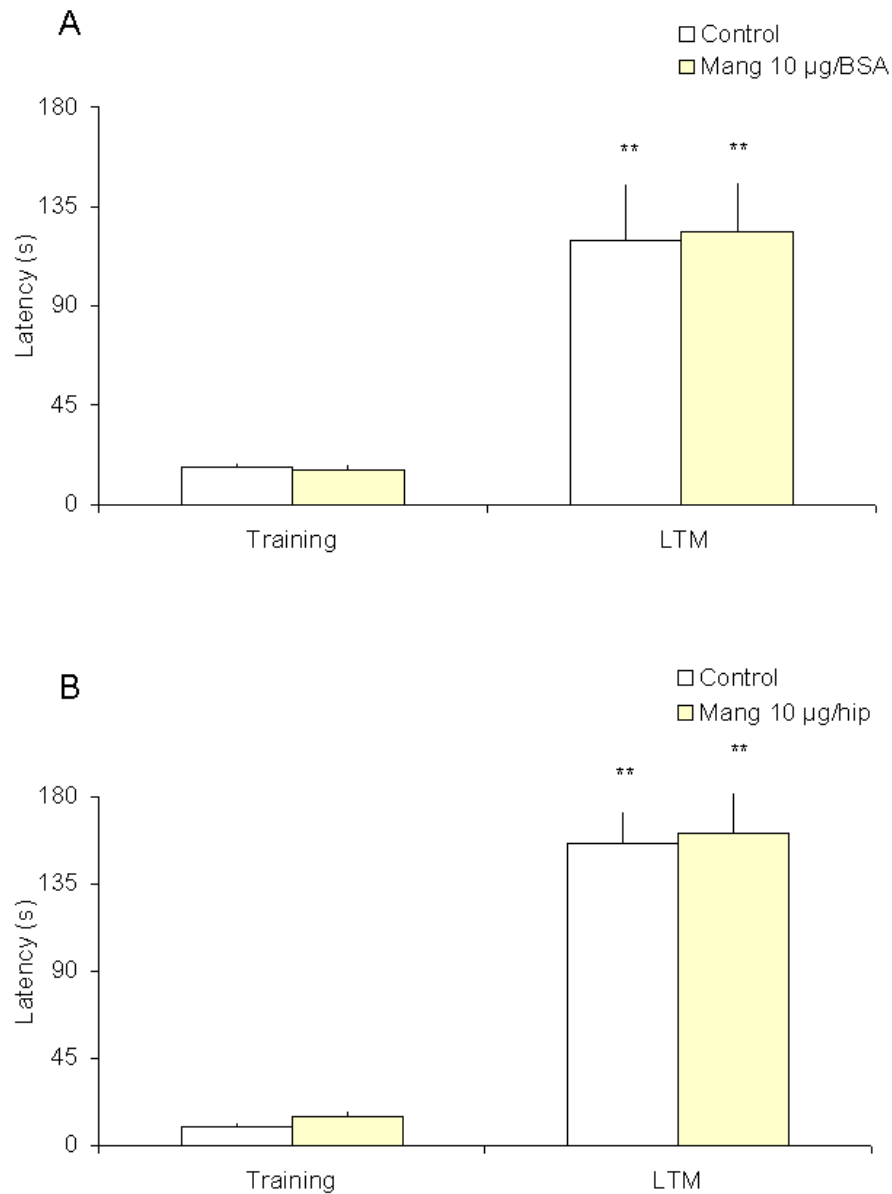


Figure 2: Mangiferin did not affect modulation of IA memory consolidation in the BLA or hippocampus. Data are mean + SEM retention in step-down latencies (s) in (A) intra-BLA (n=7 per group) and (B) dorsal hippocampus (n=8 per group) bilateral infusions. Control (DMSO-saline 10%) or mangiferin (10 μ g) infusions were given immediately after IA training. Asterisks indicate groups showing significant training-test differences (Wilcoxon test, $P_s \leq 0.001$)

The results indicate the involvement of the hippocampus in the improvement of novel object recognition consolidation memory. Extensive

pharmacological and genetic evidence indicates that consolidation of long-term memory for spatial and contextual tasks in rats involves a number of neurotransmitter receptors and intracellular signal transduction pathways, as well as protein synthesis and gene expression in the CA1 area of the dorsal hippocampus (for reviews see IZQUIERDO and MEDINA, 1997; ALBERINI, 1999; MCGAUGH, 2000; SILVA, 2003; TONEGAWA *et al.*, 2003; ROESLER and MCGAUGH, 2010). However, the impairment of memory observed by systemic administration of mangiferin was not observed in intra-BLA or intrahippocampal infusion.

The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences (MCGAUGH, 2004). The physiological plasticity following fear conditioning is not unique to the basolateral amygdala but is present in multiple brain regions (MCINTOSH and GONZALEZ-LIMA, 1998; POREMBA and GABRIEL, 2001), suggesting that fear memories are likely encoded and stored in a distributed neural network across several brain regions. Functional integrity of the hippocampus, medial septum, basolateral amygdala, nucleus of the solitary tract, and several cortical regions (insular, anterior prefrontal, and posterior cingulate) is required during an early phase of memory consolidation (immediately and up to 1.5 hours after training), whereas that of the entorhinal and parietal cortices is required during a later phase (0.5 to 3 hours or 1 to 3 hours, respectively). The functional integrity of brain regions that release neuromodulators in the hippocampus, amygdala and cortex, such as the nucleus basalis, substantia nigra, and parabrachial nucleus, is required for a couple of days after training (BERMÚDEZ-RATTONI *et al.*, 1991; IZQUIERDO *et al.*, 1997; AMBROGI LORENZINI *et al.*, 1999; MELLO e SOUZA *et al.*, 2000).

Finally, the memory improvement in NOR observed in systemic administration of mangiferin was also observed with intrahippocampal infusion, but not in the intra-BLA infusion. The memory impairment observed in the systemically IA test was not seen in the hippocampus or amygdala infusion and may be mediated by other brain region, such as the entorhinal cortex, insular cortex, or neocortical areas.

Acknowledgements

This research was partially supported by CAPES, Brazil/MES, Cuba (035/07). NM, PJ and TRP thanks to CAPES fellowship and AW thanks to CNPq

fellowship. The authors thank FAPERGS and Natália Marcondes and Lia Paim for their technical assistance.

References

ALBERINI, C. M. Genes to remember. *J Exp Biol* [S.I.], v. 202, n. 21, p. 2887-91, Nov 1999.

AMBROGI LORENZINI, C.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; SACCHETTI, B.; TASSONI, G. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], n. 71, p. 1-18, Jan 1999.

BERMÚDEZ-RATTONI, F.; INTROINI-COLLISON, I. B.; MCGAUGH, J. L. Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [S.I.], n. 88, p. 379-82, Jun 1991.

BHATIA, H. S.; CANDELARIO-JALIL, E.; DE OLIVEIRA, A. C. P.; OLAJIDE, O. A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; FIEBICH, B. L. Mangiferin inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in activated rat microglial cells. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 477, n. 2, p. 253-8, Sep 2008.

EL-SEEDI, H. R.; EL-GHORAB, D. M. H.; EL-BARBARY, M. A.; ZAYED, M. F.; GORANSSON, U.; LARSSON, S.; VERPOORTE, R. Naturally occurring xanthenes; latest investigations: isolation, structure elucidation and chemosystematic significance. *Curr Med Chem* [S.I.], v. 16, n. 20, p. 2581-626, 2009.

GARRIDO, G. G.; DELGADO, R.; LEMUS, Y.; RODRIGUEZ, J.; GARCIA, D.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG). Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 50, n. 2, p. 165-72, Aug 2004

GARRIDO, G. G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; DELPORTE, C.; DELGADO, R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 412-8, Jun 2006.

IZQUIERDO, I.; QUILLFELDT, J. A.; MEDINA, J. H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 9, n. 4, p. 786-93, Apr 1997

LIMA, M. N.; LUFT, T.; ROESLER, R.; SCHRODER, N. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 405, n. 1-2, p. 142-6, Sep 2006.

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G.; ROESLER, R. A Valepotriate Fraction of *Valeriana glechomifolia* Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], Jan 2010.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science* [S.I.], v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 2000.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 27, p. 1-28, 2004.

MCINTOSH, A. R.; GONZALEZ-LIMA, F. Large-scale functional connectivity in associative learning: interrelations of the rat auditory, visual, and limbic systems. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 80, n. 6, p. 3148-62, Dec 1998.

MELLO E SOUZA, T.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, I. Involvement of the medial precentral prefrontal cortex in memory consolidation for inhibitory avoidance learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* [S.I.], v. 66, n. 3, p. 615-22, Jul 2000.

MOSES, S. N.; COLE, C.; DRISCOLL, I.; RYAN, J. D. Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Res Bull* [S.I.], v. 67, n. 1-2, p. 62-76, Sep 2005.

MURUGANANDAN, S.; GUPTA, S.; KATARIA, M.; LAL, J.; GUPTA, P. K. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology* [S.I.], v. 176, n. 3, p. 165-73, Jul 2002.

MURUGANANDAN, S.; LAL, J.; GUPTA, P. K. Immunotherapeutic effects of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Toxicology*, nov. 215, n. 1-2, p. 56-68, Nov 2005.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 635, n. 1-3, p. 124-8, Jun 2010a.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; FARIAS, C. B.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoxyloxanthone, on fear memory in rats. *Arzneimittelforschung*, 2010b. Submitted.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2.ed. San Diego: Academic Press Inc., 1986, p. 29 to BLA and p. 35 to hippocampus.

POREMBA, A.; GABRIEL, M. Amygdalar efferents initiate auditory thalamic discriminative training-induced neuronal activity. *J Neurosci* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 270-8, Jan 2001.

ROESLER, R.; LESSA, D.; VENTURELLA, R.; VIANNA, M. R.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A.; IZQUIERDO, I.; SCHWARTSMANN, G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 1041-5, Feb 2004.

ROESLER, R.; LUFT, T.; OLIVEIRA, S. H. S.; FARIAS, C. B.; ALMEIDA, V. R.; QUEVEDO, J.; DAL PIZZOL, F.; SCHRÖDER, N.; IZQUIERDO, I.; SCHWARTSMANN, G. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* [S.I.], v. 51, n. 2, p. 350-7, Aug 2006.

ROESLER, R.; MCGAUGH, J. L. Memory Consolidation. In: KOOB, G. F.; LE MOAL, M.; THOMPSON, R. F. (eds.). *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, v. 2, p. 206-14. Oxford: Academic Press, 2010.

SÁNCHEZ, G. M.; RE, L.; GIULIANI, A.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DAVISON, G. P.; LEÓN-FERNÁNDEZ, O. S. Protective effect of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) on the injury associated with hepatic ischaemia reperfusion. *Pharmac Res* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 565-73, Dec 2000.

SILVA, A. J. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J Neurobiol* [S.I.], v. 54, n. 1, p. 224-37, Jan 2003.

STECKLER, T.; DRINKENBURG, W. H.; SAHGAL, A.; AGGLETON, J. P. Recognition memory in rats--I. Concepts and classification. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 54, n. 3, p. 289-311, Feb 1998.

TONEGAWA, S.; NAKAZAWA, K.; WILSON, M. A. Genetic neuroscience of mammalian learning and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [S.I.], v. 358, n. 1432, p. 787-95, Apr 2003.

1.4 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 4

O artigo "*Mangifera indica* L. extract, but not mangiferin improved the memory for aversive training in spinocerebellar ataxia type 2 transgenic mice" descreve os experimentos que realizei em Cuba, avaliando o efeito de um extrato padronizado de *M. Indica* e do composto majoritário de *M. indica* (mangiferina), em parâmetros neurocomportamentais relacionados à memória em camundongos transgênicos, com ataxia espinocerebelar do tipo 2 (SCA-2).

Ataxia, derivado de uma palavra grega que significa "falta de ordem", pode ser definida como diminuição da coordenação, com importante fraqueza muscular (BURKE e HAMMANS, 2008). As ataxias espinocerebelares (SCAs) são clinicamente e geneticamente um grupo heterogêneo de enfermidades neurodegenerativas autossômicas dominantes (de diferentes tipos) que se caracterizam pela lenta e progressiva disfunção cerebelar (ALBIN, 2003; EVIDENTE *et al.*, 2000; SCHÖLS *et al.*, 2004; SEQUEIROS *et al.*, 2010), com perda de células de Purkinje e granulares, neurônios, substância negra e células do corno anterior da medula espinhal (SCHOLS *et al.*, 2004).

A principal característica clínica da SCA do tipo 2 (SCA-2) é a presença de ataxia cerebelar, atrofia cerebelar, que pode ser observada em exames de neuroimagem, neuropatia periférica e movimentos oculares sacádicos lentos. Outras manifestações clínicas incluem a distonia, coreia, parkinsonismo, mioclonia e demência (KLOCKGETHER *et al.*, 1998), disartria, tremor, fasciculações na face e membros (DURR e BRICE, 2000). Os déficits cognitivos foram descritos com uma frequência de 5 a 19% em pacientes com SCA-2 (BÜRK *et al.*, 1999).

A caracterização molecular revelou que o *locus* SCA-2 foi mapeado no cromossomo 12 (12q24.13), e a mutação genética responsável pela doença é de uma expansão de trinucleotídeos CAG, com 34 a 59 repetições (EVERETT e WOOD, 2004; SCHÖLS *et al.*, 2004).

SCAs têm uma prevalência de cerca de 1 a 5 casos por 100.000 pessoas (VAN de WARREMBURG *et al.*, 2002; ERICHSEN *et al.*, 2009). A prevalência de SCA-2 encontrada na província de Holguin, em Cuba, foi de 41 por 100.000, muito superior à da parte ocidental de Cuba ou de outras partes do mundo (OROZCO *et al.*, 1989), especialmente na cidade de Baguanos (onde foi constatada a incidência

de 129,2 casos por 100.000 habitantes), representando uma das maiores taxas de SCA do mundo (VELÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2001).

Devido à alta incidência dessa enfermidade em Cuba, foram desenvolvidos camundongos transgênicos pelo “Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología” (CIGB) de Havana, Cuba. Um fragmento humano purificado SCA-2 foi micro injetado nos pró-núcleos de camundongos híbridos B6D2F1 X OF1 (AGUIAR *et al.*, 2006). Os animais transgênicos resultantes apresentam a expressão ubíqua do DNAc humano longo SCA-2-(CAG)₇₅, com um padrão de distribuição semelhante ao observado em humanos, a degeneração específica dos neurônios de Purkinje que leva a um início precoce do fenótipo atáxico, e estabilidade das repetições de CAG. Assim, este modelo foi considerado adequado para a avaliação dos diferentes candidatos terapêuticos para tratar ou retardar o aparecimento desta doença incurável em seres humanos (AGUIAR *et al.*, 2006). Os resultados do deficit de locomoção, avaliado pelo teste “rota- rod”, ainda não foram publicados pela equipe cubana de colaboração internacional do projeto CAPES/MES Cuba.

Devido às atividades biológicas de moléculas presentes no ECAM e de mangiferina (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000a; 2000b; 2001a; 2001b; LOY *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2003), testamos o efeito desses compostos nos camundongos atáxicos. Este artigo foi enviado para publicação no “Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA)”.

Artigo 4

Mangifera indica L. extract, but not mangiferin improved the memory for aversive training in spinocerebellar ataxia type 2 transgenic mice

Natasha Maurmann^{1,2}, Yeny Lemus-Molina³, Rafael Roesler^{1,2}, René Delgado-Hernández⁴, Gilberto L. Pardo-Andreu⁵

¹*Laboratory of Molecular Neuropharmacology (Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences), Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.*

²*National Science and Technology Institute (INCT) for Translational Medicine (TM). Brazil.*

³*Center of Pharmaceutical Chemistry. Ciudad de La Habana, Cuba.*

⁴*National Center for Clinical Trials. Ciudad de La Habana, Cuba.*

⁵*Center for Survey Research and Biological Evaluations Institute of Pharmacy and Food. University of La Habana. Ciudad de La Habana, Cuba*

Abstract

The spinocerebellar ataxia type 2 (SCA-2) is a progressive neurodegenerative disorders without specific therapy identified, and it is related to the loss of function in the cerebellum, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurotoxicity processes. Scientific evidence indicates that a plant *Mangifera indica* L extract (MiE) and its major constituent (mangiferin) display antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions. Given the several biological actions of MiE and mangiferin we investigated their effects on behavioral outcomes of neurological function in SCA-2 transgenic mice. The females were treated orally during 12 months in the concentration of 10, 50, 100mg/kg of MiE or 10mg/kg of mangiferin and was evaluate locomotion (open-field), aversive memory (inhibitory avoidance) and declarative memory (object recognition). The administrations of the MiE did not affect the object recognition memory, but and mangiferin affected. The MiE improved selectively the aversive memory in SCA-2 mice, indicate that MiE can affect behavioral parameters regarding fear-related memory and the SCA-2 female mangiferin treated showed no

learning. Although further experiments are necessary to clarify the effect of MiE, these findings constitute the basis for the use of the natural extract in the prevention/treatment of memory deficits in SCA-2 and probably in other neurodegenerative diseases, including aging.

Keywords:

Mangifera indica – spinocerebellar ataxia type 2 – memory – novel object recognition – open-field – step-down inhibitory avoidance

Resumen

La ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA-2) es un trastorno neurodegenerativo progresivo sin tratamiento específico identificado y que se relaciona con la pérdida de la función del cerebelo, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y procesos de neurotoxicidad. Evidencias científicas indican que un extracto de la planta *Mangifera indica* L (MiE) y su componente principal (mangiferina) presenta acciones antioxidantes, anti-inflamatorias y neuroprotectoras. Debido a las múltiples acciones biológicas de MiE y mangiferina, investigamos sus efectos en los resultados del comportamiento de la función neurológica en ratones transgénicos SCA-2. Las hembras fueron tratadas por vía oral durante 12 meses en la concentración de 10, 50, 100mg/kg de MiE o 10mg/kg de mangiferina y se evaluó la locomoción (campo abierto), la memoria aversiva (evitación inhibitoria) y la memoria declarativa (reconocimiento de objetos). Las administraciones de MiE no afectó la memoria de reconocimiento de objetos y mangiferin afectó. MiE mejora la memoria aversiva en ratones SCA-2, lo que indica que MiE puede afectar parámetros de comportamiento en relación a la memoria asociada con el miedo y las hembras SCA-2 tratadas con mangiferina no mostraron aprendizaje. Aunque más experimental se necesitan para aclarar los efectos de MiE, estos resultados constituyen un fundamento para el uso del extracto natural en la prevención/tratamiento de los déficits de memoria en SCA-2 y, probablemente, en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el envejecimiento.

Palabras Clave

Mangifera indica – ataxia espinocerebelosa tipo-2 – memoria – reconocimiento de nuevos objetos – campo abierto – evitación inhibitoria

Título corto

MiE and mangiferin affect memories in SCA-2 transgenic mice.

Lista de abreviaciones

MiE: *Mangifera indica* L extract; SCA-2: spinocerebellar ataxia type 2.

Introduction

Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA-2) is a progressive and rather incapacitating disorder, with no treatment available. The main clinical manifestations of SCA-2 are cerebellar gait ataxia, dysmetria, adiadochokinesis and dysarthria, as well as saccadic and slow ocular movements, hypotonia and abnormal tendon reflexes (OROZCO *et al.*, 1990). SCA-2 is caused by the expansion of a CAG repeated in the coding region of the ataxin-2 gene to more than 31 repetitions. It is relatively rare worldwide, but common in the eastern part of Cuba, with a prevalence of 50 patients per 100,000 (PULST, 2003). The Spinocerebellar ataxias are related to the loss of function in the cerebellum, mitochondrial dysfunction, and neurotoxicity processes. Oxidative stress is a key factor in the pathogenesis of inherited ataxias, but the mechanisms involved vary between different conditions. So, there is a rationale for testing antioxidants in ataxias attributable to DNA repair defects, autosomal-dominant spinocerebellar ataxias and ataxias with primary mitochondrial dysfunction (PANDOLFO, 2008).

Polyphenols represent a group of secondary metabolites that widely occur in plants and have been studied for their strong antioxidant capacities and others properties, by which cell functions are regulated (HAN *et al.*, 2007). The composition of *M. indica* includes a mixture of polyphenols, terpenoids, steroids, fatty acids and microelements. A detailed phytochemical investigation of mango stem bark extract

has led to the isolation of seven phenolic constituents: gallic acid, 3,4-dihydroxy benzoic acid, gallic acid methyl ester, gallic acid propyl ester, mangiferin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, benzoic acid and benzoic acid propyl ester; mangiferin was found to be the predominant component (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002). The polyphenol mangiferin, a xanthone glucoside, has been reported to have multiple biological effects, as antioxidant and immunomodulatory (LEIRO *et al.*, 2003), anti-allergic (RIVERA *et al.*, 2006), anti-inflammatory and antinociceptive (GARRIDO *et al.*, 2004a). Based on phytochemistry composition and on ethnopharmacological knowledge, a standardized aqueous extract from the bark of selected species of *Mangifera indica* L. (MiE) has been developed in Cuba as a food supplement, under the brand name of Vimang® (GUEVARA-GARCÍA *et al.*, 2004). This extract is proposed as a nutritional supplement (antioxidant) and an anti-inflammatory, analgesic and immunomodulatory treatment to prevent disease progress or increase the patient's quality of life in gastric and dermatological disorders, AIDS, cancer and asthma (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002).

To explore the biological mechanisms of action, it has shown potent *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities, in a range of experimental models apparently due to phenolic components (PARDO-ANDREU *et al.*, 2008). In addition, MiE produces analgesia and anti-inflammatory effects in rodent models (GARRIDO *et al.*, 2004a), modulates macrophage function (LEIRO *et al.*, 2004) and mouse humoral immune responses (GARCIA *et al.*, 2003), and protects against septic shock in a rodent model (GARRIDO *et al.*, 2004b). Cellular mechanisms mediating the actions of Vimang® might include inhibition of T cell proliferation, tumor necrosis factor (TNF- α)-induced activation of nuclear factor kB (NF-kB), interleukin-1beta-induced (IL-1B), nitric oxide synthase (iNOS) expression, and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007). Recently, it was found that MiE prevent glutamate-induced excitotoxicity in primary cultured neurons of the rat cerebral cortex (LEMUS-MOLINA *et al.*, 2009).

The Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba has generated a unique SCA-2 transgenic animal mouse, microinjecting a human purified SCA-2 transgenic fragment (AGUIAR *et al.*, 2006). Given the several biological actions of MiE and mangiferin, especially those related with their antioxidant potential, we investigated the effect of MiE and mangiferin on behavioral outcomes of neurological function in SCA-2 transgenic mice.

Methods

Preparation of *Mangifera indica* L. extract (MiE)

Stem bark extracts of *Mangifera indica* L. were prepared by decoction in water, concentrated by evaporation and spray dried to obtain a fine brown powder, coded as 112, that melted at 210–215°C with decomposition and contained the active ingredient used in Vimang® pharmaceutical formulations. Planar, liquid and gas chromatographic methods, mass spectrometry and UV/VIS spectrophotometry, showed them to contain polyphenols as major (45%) fraction (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002). Mangiferin (2- β -d-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxy-9H-xanthen-9-one), supplied by the Centre of Pharmaceutical Chemistry (Cuba), had been purified from MiE by extraction with methanol; HPLC showed it to be 95% pure.

Experimental animals

Drugs and pharmacological procedures

Adult female mice F066 transgenic (with SCA-2) and the founder animals B6D2F1 (wild-type control) (AGUIAR *et al.*, 2006) were obtained from the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Havana, Cuba). After division into seven groups of at least five animals, the mice were treated daily, during 12 months, with oral administration of water (untreated control wild-type or untreated SCA-2 transgenic groups); as well as 10, 50, 100mg/kg of MiE and 10mg/kg of mangiferin in the SCA-2 transgenic animals, and the higher dose of MiE (100mg/kg) in the founder animals (control wild-type) in order to perform the memory test. MiE and mangiferin solutions for the animal's treatment were daily prepared in distilled water. The animals were kept on a 12h light/dark cycle with food (Standard diet for rodents, CENPALAB) and water available *ad libitum*, housed in a controlled environment at 20 \pm 2°C. The transgenic SCA-2 male mice also were used (data not showed). Given the probable greater severity of disease in males, some animals died, reducing the sample size, not allowing consistent data. All procedures were conducted from 10 a.m. to 5 p.m., and were approved by the institutional animals care committee. The same animals were used in all tests, at one week interval.

Experimental protocol of behavioral tests

Open-field behavior

Open-field exploration was carried out as previously described (MAURMANN *et al.*, 2010). The open-field was performed in a 60×45×50cm arena. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines.

The mice were put in the arena, placed on its left rear quadrant and left to freely explore it for 5min. Latency to start locomotion, crossings of the black lines, rearings performed and the number of fecal pellets were counted. The number of crossings and rearings were used respectively as measures of locomotor activity and exploratory behavior, whereas the latency to start locomotion and the number of fecal pellets were used as a measure of anxiety (MAURMANN *et al.*, 2010). Twenty-four hours later, the animals were left to explore the apparatus again for another 5min., and the same measures were recorded to evaluate habituation to the open-field.

Novel object recognition

The novel object recognition task was performed as previously described (MAURMANN *et al.*, 2010; PARDO *et al.*, 2010a). Object recognition training and test trials took place in the same arena used for the open-field.

Training was conducted by placing individual mice for 5min. into the arena, in which 2 identical objects (objects A1 and A2) were positioned in 2 adjacent corners, 10cm from the walls. In a long-term memory retention test given 24h after training, the same mice explored the field for 5min. in the presence of a familiar object A1 and a novel object B. Between trials the objects were washed with 70% ethanol solution. All objects presented similar textures and sizes, but distinctive colors and shapes. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. The exploratory preference or the object recognition index was defined as the percentage of the total exploration time that the animal spent investigating object A2 (in the training trial) or the novel object.

Inhibitory avoidance

Inhibitory avoidance in rodents is a widely used animal model of fear-related learning and memory. The step-down inhibitory avoidance apparatus and procedures were described in previous study (MAURMANN *et al.*, 2010; PARDO-ANDREU *et al.*, 2010b). The inhibitory avoidance test apparatus was a box of 30x21x18.5cm (Insight®, Riberão Preto, SP, Brazil) whose floor consisted of parallel stainless steel bars (1mm diameter) spaced 1cm apart with a 2cm high platform placed on the right side.

In the training trial, animals were placed on the platform, and their latency to step-down on the grid with all 4 paws was recorded; immediately after stepping down on the grid, animals were given a 0.3mA/3s footshock. In the retention test session carried out 24h after training (long-term memory retention), no footshocks were given when stepping-down on the grid, and a ceiling of 180s was imposed in the test latency.

Statistical Analysis

Quantitative data were expressed as mean + standard error. Comparisons among groups were performed using Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann–Whitney U (non-parametric data) post-hoc tests when necessary. Comparisons among behavioral trials within the same group (comparisons between open-field behavior session and habituation session in the open-field test, comparisons between training and test sessions in the novel object recognition and in the inhibitory avoidance) were made by Wilcoxon test. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the statistical software package SPSS.

Results

Open-field behavior and open-field habituation

In the open-field behavior, there were not significant differences among groups in the latency to start locomotion ($P=0.12$) (Figure 1a). MiE and mangiferin

treatments did not affect the number of crossings (Figure 1b), but showed a statistical trend ($P=0.09$). They also did not influence the number of rearing ($P=0.40$) and fecal pellets ($P=0.15$).

There was a significant decrease between latencies among the open-field session and the habituation session in the SCA-2 treated with MiE-100 and mangiferin, indicating habituation memory ($*P_s < 0.05$, Wilcoxon test) (Figure 1a). There were not significant differences among groups in the number of crossings, although a statistical trend ($P=0.06$) (Figure 1b), indicating a trend in alterations in locomotion. There were not significant number of fecal pellets ($P=0.08$) or number of rearings ($P=0.50$), indicating a trend in reduction of exploratory behavior between groups in the habituation session, compared with the SCA-2 untreated animals.

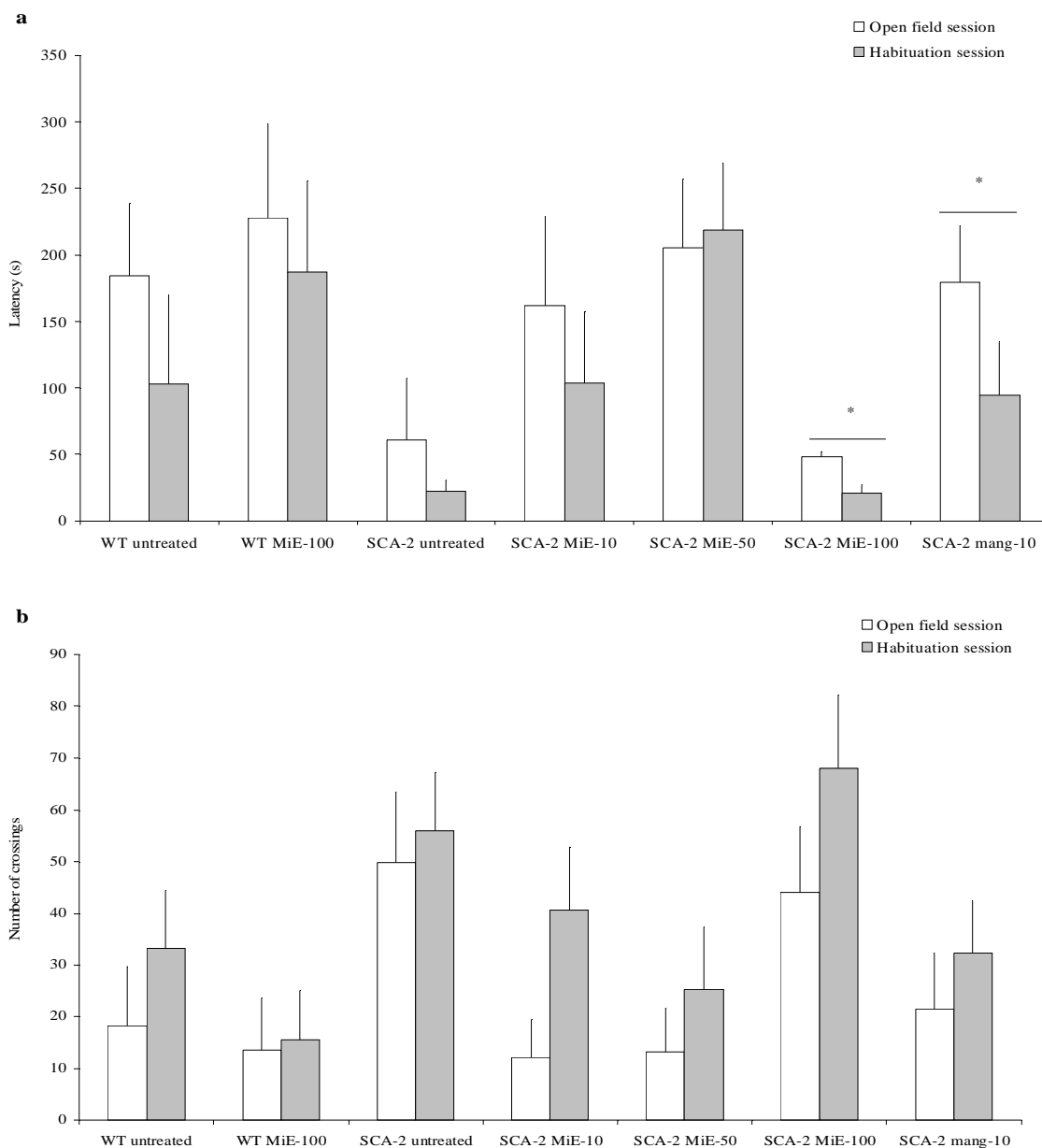


Figure 1: Open-field behavior and habituation in healthy wild type mice (WT) or SCA-2 (transgenic) orally treated with MiE (10, 50 or 100mg/kg) or mangiferin (mang 10mg/kg) for 12 months. Animals were left to freely explore the arena for 5min. a day, during two days. Bars are mean + S.E.M of latency to start locomotion (a) and number of crossings (b) during training (open-field, light columns) or test (habituation, gray columns). In a, * indicates $P \leq 0.05$, a significant difference between open-field session and habituation session

Novel object recognition

Results for novel object recognition memory are shown in Figure 2. There were no significant differences among groups in the exploratory preference between

objects in the training trial ($P=0.89$). In addition, there was no significant difference among groups in long-term memory retention test, carried out 24h after training ($P=0.14$). In this no aversive memory, there were significant training-test differences only in the mangiferin group ($P=0.046$). The results indicate that oral administration of *Mangifera indica* extract did not affect, whereas mangiferin affects the novel object recognition memory in SCA-2 mice.

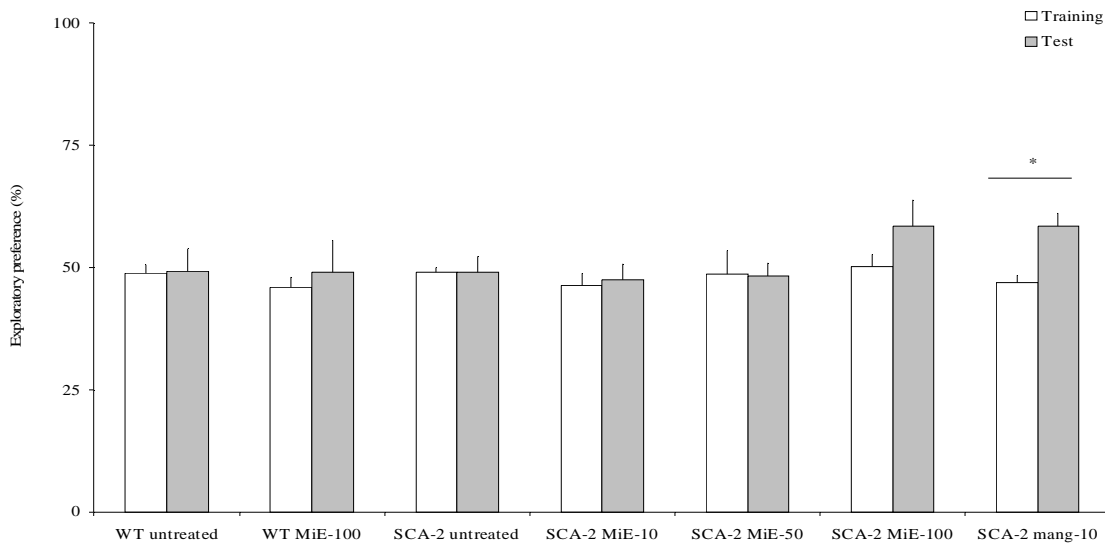


Figure 2: Novel object recognition memory in healthy wild type mice (WT) or SCA-2 (transgenic) orally treated with MiE (10, 50 or 100mg/kg) or mangiferin (mang 10mg/kg) for 12 months. Data are mean + S.E.M. Exploratory preferences was the % of time exploring one object during training (light columns) or the novel object during test (gray columns). Memory retention was tested 24h after training. * indicates $P < 0.05$, significant difference between training and test

Inhibitory avoidance

Results for inhibitory avoidance are shown in Figure 3. There were significant statistical differences among treatments in the training ($P=0.004$) and in the test ($P=0.0001$) by Kruskal–Wallis analysis. The animals MiE treated in all doses (10, 50 and 100mg/kg) showed learning in the aversive memory (inhibitory avoidance task) – an effect that was not observed in mangiferin treatment. Curiously, the ability of the control wild type mice to remember the aversive stimulus they received during training (see the statistical differences between training and test tasks in healthy control Figure 3) is not observed in the transgenic mice that probably have lost their capacity to learn or build up memory from an aversive stimulus. The MiE treatment

restored this ability. The facilitatory effect of the extract is not related to non-mnemonic influences of MiE by itself on locomotor performance, since the open-field results showed no difference between training and test crossings (Figure 1b).

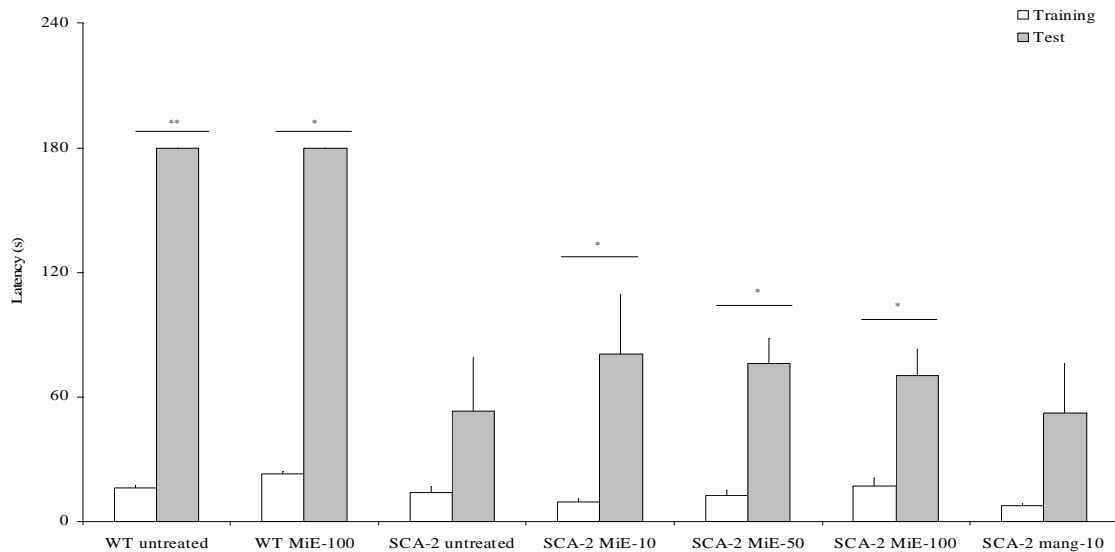


Figure 3: Fear-related memory assessed in an inhibitory avoidance task in healthy wild type mice (WT) or SCA-2 (transgenic) orally treated with MiE (10, 50 or 100mg/kg) or mangiferin (mang 10mg/kg) for 12 months. Memory retention was tested 24h after training. Bars are mean + S.E.M. Latencies to step-down (s) of training (light columns) or test (gray columns). * $P < 0.05$ and ** $P \leq 0.01$ indicate significant difference between training and test

Discussion and conclusion

Mangiferin is the majority compound of the *Mangifera indica* extract (approximately 7g/100g dry weight of MiE) (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002). In this work, the only group that showed learning in the novel object recognition memory was SCA-2 female mice treated with mangiferin (the MiE did not influence the object recognition memory). Mangiferin improved object recognition memory in healthy rats through a mechanism that might involve an increase in neurotrophin and cytokine levels (PARDO-ANDREU *et al.*, 2010a). This glycosyl xanthone did not affect the inhibitory avoidance memory in SCA-2. This results are consistent with recent experiments in which mangiferin impaired the fear memory in rats (PARDO-ANDREU *et al.*, 2010b). Although mangiferin is the polyphenolic compound of the highest concentration of MiE, it presents a profile of biological activity distinct from MiE, probably due to the numerous molecules with biological activities present in the

whole extract. Along with the xanthone mangiferin, MiE contains other polyphenols, including phenolic acids (gallic, 3,4-dihydroxy benzoic, and benzoic acids), phenolic esters (methyl gallate, propyl gallate, propyl benzoate) and flavan-3-ols (catechin/epicatechin). The effect of the substances mentioned above could be ascribed to catechin and epicatechin, which are the second and third main components of MiE (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002). In this regard, it has been shown that a catechin-enriched tea extract reversed scopolamine-induced retention deficits in both step-through passive avoidance and spontaneous alteration behavior tasks (KIM *et al.*, 2004). Nevertheless, we believe that additive and/or synergistic effects of the complex mixtures of phytochemicals, instead of a single component, are probably responsible for the learning observed in the inhibitory test elicited by MiE treatment, something that mangiferin alone did not produce.

Together, the data suggest that acute oral administration of MiE (a mixture of active molecules) improve emotionally-motivated memory without affecting other aspects of behaviour, namely non-associative memory, locomotion and exploratory behaviour. In fact, clinical interventions with the extract in AIDS patients or elderly persons did not produce visible evidences of neurological deterioration, even at 2-6 months of daily treatment (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007). Since memory deficits have been reported for SCA (BÜRK *et al.*, 2003), aging and Alzheimer disease persons (BUCKNER *et al.*, 2004), our present findings, viewed together with the evidenced lack of toxicity and clinical safety of MiE (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007), constitute a rationale in the use of the natural extract for the prevention/treatment of memory deficits in SCA-2 and probably in other neurodegenerative diseases, including aging. Further experiments are required to clarify the mechanisms underlying the improving effect of MiE on aversive memory and the effect of mangiferin in the recognition memory. Biological evidence indicates that synaptic plasticity and memory consolidation depends of early molecular mechanisms, including the activation of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), the phospholipase C (PLC)/protein kinase C (PKC), the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA), the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathways (ROESLER and MCGAUGH, 2010). It is possible that mangiferin and other biologically active compounds of MiE influences these molecular mechanisms involved in synaptic plasticity.

Acknowledgements

This work was partially supported by CAPES, Brazil/MES, Cuba (035/07). NM thanks to CAPES for PhD fellowships and PPGBCM by support. We are grateful to Dr. Jorge Aguiar (CIGB) for providing the SCA-2 transgenic mice, and to Aylín Amador and Leonel Heredia for technical assistance.

References

- AGUIAR, J.; FERNANDEZ, J.; AGUILAR, A.; MENDOZA, Y.; VAZQUEZ, M.; SUAREZ, J.; BERLANGA, J.; CRUZ, S.; GUILLEN, G.; HERRERA, L.; VELAZQUEZ, L.; SANTOS, N.; MERINO, N. Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 392, n. 3, p. 202-6, Jan 2006.
- BUCKNER, R. L. Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 195-208, Sep 2004.
- BÜRK, K.; GLOBAS, C.; BOSCH, S.; KLOCKGETHER, T.; ZUHLKE, C.; DAUM, I.; DICHGANS, J. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *J Neurol* [S.I.], v. 250, n. 2, p. 207-11, Feb 2003.
- GARCIA, D.; LEIRO, J.; DELGADO, R.; SANMARTIN, M. L.; UBEIRA, F. M. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytother Res* [S.I.], v. 17, n. 10, p. 1182-7, Dec 2003.
- GARRIDO, G. G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCIA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* l. extract (vimang). *Pharmacol Res* [s.i.], v. 50, n. 2, p. 143-9, Aug 2004a.
- GARRIDO, G. G.; DELGADO, R.; LEMUS, Y.; RODRIGUEZ, J.; GARCIA, D.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* l. (Vimang). Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacol Res* [s.i.], v. 50, n. 2, p. 165-72, Aug 2004b.
- GUEVARA-GARCÍA, M.; GONZÁLEZ-LAIME, S.; ÁLVAREZ-LEÓN, A.; RIAÑO-MONTALVO, A.; GARRIDO, G. G.; NUÑEZ-SELLÉS, A.J. Uso etnomédico de la corteza de *Mangifera indica* L. en Cuba. *Rev Cubana Plant Med* [S.I.], v. 9, p. 1-9, Jan-Apr 2004.
- HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci* [S.I.], v. 8, p. 950-988, Sep 2007.

KIM, H. K.; KIM, M.; KIM, S.; CHUNG, J. H. Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities. *Biosci Biotechnol Biochem* [S.I.], v. 68, n. 9, p. 1977-9, Sep 2004.

LEIRO, J. M.; ALVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; SISO, I. G.; ORALLO, F. *In vitro* effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 65, n. 8, p. 1361-71, Apr 2003.

LEIRO, J.; ARRANZ, J. A.; YÁÑEZ, M.; UBEIRA, F. M.; SANMARTÍN, M. L.; ORALLO, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int Immunopharmacol* [S.I.], v. 4, n. 6, p. 763-78, Jun 2004.

LEMUS-MOLINA, Y.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; DELGADO-HERNÁNDEZ, R.; MATUTE, C. *Mangifera indica* L. extract attenuates glutamate-induced neurotoxicity on rat cortical neurons. *Neurotoxicology* [S.I.], v. 30, n. 6, p. 1053-8, Nov 2009.

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G.; ROESLER, R. A Valepotriate Fraction of *Valeriana glechomifolia* Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], Jan 2010.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VELEZ-CASTRO, H. T.; AGUERO-AGUERO, J.; GONZÁLEZ, G. J.; NADEO, F.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J Agric Food Chem* [S.I.], v. 50, n. 4, p. 762-6, Feb 2002.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; GARRIDO, G. G.; GARCIA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCIA, M.; PARDO-ANDREU, G. L. The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 351-8, May 2007.

OROZCO, G.; NODARSE, A.; CORDOVES, R.; AURBURGER, G. Autosomal dominant cerebellar ataxia: Clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguín, Cuba. *Neurology* [S.I.], v. 40, n. 9, p. 1369-75, Sep 1990.

PANDOLFO, M. Drug Insight: antioxidant therapy in inherited ataxias. *Nat Clin Pract Neurol* [S.I.], v. 4, n. 2, p. 86-96, Feb 2008.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M. F.; CURTI, C.; HERNÁNDEZ, I.; MERINO, N.; LEMUS, Y.; MARTÍNEZ, I.; RIAÑO, A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rats serum and liver. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 79-86, Jan 2008.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. R.; FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Mangiferin, a

naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 635, n. 1-3, p. 124-8, Jun 2010.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; FARIAS, C. B.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoxylxanthone, on fear memory in rats. *Arzneimittelforschung*, 2010b. Submitted.

PULST, S. M. Spinocerebellar ataxia. In: PULST, S. M. (Ed.). *Genetics of movement disorders*. San Diego: Academic Press, p. 47-53, 2003.

RIVERA, D. G.; BALMASEDA, I. H.; LEON, A. A.; HERNANDEZ, B. C.; MONTIEL, L. M.; GARRIDO, G. G.; CUZZOCREA, S.; HERNANDEZ, R. D. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *J Pharm Pharmacol* [S.I.], v. 58, n. 3, p. 385-92, Mar 2006.

ROESLER, R.; MCGAUGH, J. L. Memory Consolidation. In: KOOB, G. F.; LE MOAL, M.; THOMPSON, R. F. (org.). *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. Oxford: Academic Press, v. 2, p. 206-14, 2010.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO CAPÍTULO 1

AGUIAR, J.; FERNANDEZ, J.; AGUILAR, A.; MENDOZA, Y.; VAZQUEZ, M.; SUAREZ, J.; BERLANGA, J.; CRUZ, S.; GUILLEN, G.; HERRERA, L.; VELAZQUEZ, L.; SANTOS, N.; MERINO, N. Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 392, n. 3, p. 202-6, Jan 2006.

ALBIN, R. L. Dominant ataxias and Friedreich ataxia: an update. *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 16, n. 4, p. 507-14, Ago 2003.

BÜRK, K.; BLOBAS, C.; BÖSCH, S.; GRÄBER, S.; ABELE, M.; BRICE, A.; DICHGANS, J.; DAUM, I.; KLOCKGETHER, T. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia 2. *Brain* [S.I.], v. 122, n. 4, p. 769-77, 1999.

BURKE, G.; HAMMANS, S. Ataxia. *Medicine* [S.I.], v. 36, n. 10, p. 540-4, 2008.

DURR, A.; BRICE, A. Clinical and genetic aspects of spinocerebellar degeneration. *Curr Opin Neurol* [S.I.], v. 13, n. 4, p. 407-13, Ago 2000.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1988.

ERICHSEN, A. K.; KOHT, J.; STRAY-PEDERSEN, A.; ABDELNOOR, M.; TALLAKSEN, C. M. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain* [S.I.], v. 132, n. Pt 6, p. 1577-88, Jun 2009.

EVERETT, C. M.; WOOD, N. W. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* [S.I.], v. 127, n. Pt 11, p. 2385-405, Nov 2004.

EVIDENTE, V. G.; GWINN-HARDY, K. A.; CAVINESS, J. N.; GILMAN, S. Hereditary ataxias. *Mayo Clin Proc* [S.I.], v. 75, n. 5, p. 475-90, May 2000.

GEIGER, B. M.; FRANK, L. E.; CALDERA-SIU, A. D.; POTHOS, E. N. Survivable stereotaxic surgery in rodents. *J Vis Exp* [S.I.], n. 20, 2008.

GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SANCHEZ-GOMEZ, M. V.; ALBERDI, E.; ARRANZ, A.; DELGADO-GARCIA, J. M.; GRUART, A.; MATUTE, C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 374-86, Ago 2006.

GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 443-51, Nov-Dez 1996.

GUILLÉN, B.; ACOSTA, J.; AMARO, D.; QUESADA, I.; CEDEÑO, E.; MARRERO, J. R. 2000. Reglamento Tecnológico Vimang, ingrediente activo (escala 2000 litros).

Informe Técnico do Centro de Química Farmacéutica. Empresa "Mario Muñoz" 05/00, Jan 2000.

IBARRETXE, G.; SANCHEZ-GOMEZ, M. V.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; ALBERDI, E.; MATUTE, C. Differential oxidative stress in oligodendrocytes and neurons after excitotoxic insults and protection by natural polyphenols. *Glía* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 201-11, Jan 2006.

ICHIKI, H.; MIURA, T.; KUBO, M.; ISHIHARA, E.; KOMATSU, Y.; TANIGAWA, K.; OKADA, M. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol Pharm Bull* [S.I.], v. 21, n. 12, p. 1389-90, Dez 1998.

JUNG, K.; LEE, B.; HAN, S. J.; RYU, J. H.; KIM, D. H. Mangiferin ameliorates scopolamine-induced learning deficits in mice. *Biol Pharm Bull* [S.I.], v. 32, n. 2, p. 242-6, Fev 2009.

KLOCKGETHER, T.; LÜDTKE, R.; KRAMER, B., ABELE, M.; BÜRK, K.; SCHÖLS, L.; RIESS, O.; LACCONI, F.; BOESCH, S.; LOPES-CENDES, I.; BRICE, A.; INZELBERG, R.; ZILBER, N.; DICHGANS, J. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* [S.I.], v. 121 (Pt 4), p. 589-600, Abr 1998.

LEIRO, J. M.; ALVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; SISO, I. G.; ORALLO, F. *In vitro* effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta genes. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 65, n. 8, p. 1361-71, Abr 2003.

LEIRO, J.; ARRANZ, J. A.; YÁÑEZ, M.; UBEIRA, F. M.; SANMARTÍN, M. L.; ORALLO, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int Immunopharmacol* [S.I.], v. 4, n. 6, p. 763-78, Jun 2004.

LOY, S.; SIMÓN, R.; DELGADO, R. Vimang: Un potencial protector de la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad. *Rev Cubana Invest Bioméd* [S.I.], v. 21, p. 167-170, Jul-Set 2002.

MANDOLESI, L.; LEGGIO, M. G.; SPIRITO, F.; PETROSINI, L. Cerebellar contribution to spatial event processing: do spatial procedures contribute to formation of spatial declarative knowledge? *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 18, n. 9, p. 2618-26, Nov 2003.

MARANCA, G. *Fruticultura comercial: manga e abacate*. (3.ed.) São Paulo: Nobel, 1978.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; RE, L.; GIULIANI, A.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; PÉREZ-DAVISON, G.; LEÓN-FERNÁNDEZ, O. S. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin, and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 565-73, Dez 2000a.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; DELGADO, R.; PÉREZ DAVISON, G.; GARRIDO, G. G.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of *Mangifera indica* L. Extract (Vimang). *Phytother Res* [S.I.], v. 14, n. 6, p. 424-7, Set 2000b.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; GIULIANI, A.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S.; PÉREZ DAVISON, G.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Effect of *Mangifera indica* L. extract (QF808) on protein and hepatic microsome peroxidation. *Phytother Res* [S.I.], v. 15, n. 7, p. 581-5, Nov 2001a.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; CANDELARIO JALIL, E.; GIULIANI, A.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S.; RAM, S.; DELGADO, R.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) reduces ischaemia-induced neuronal loss and oxidative damage in gerbil brain. *Free Radic Res* [S.I.], v. 35, n. 5, p. 465-73, Nov 2001b.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; RODRIGUEZ, M.A.; GIULIANI, A.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; PONS, N.; LEON, O.S.; RE, L. Protective effect of *Mangifera indica* L extract (Vimang) on the injury associated with hepatic ischaemia reperfusion. *Phytother Res* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 197-201, Mar 2003.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; DELGADO, R.; GARRIDO, G. G.; GUEVARA-GARCIA M.; GARCIA-RIVERA D.; PAÉZ-BETANCOURT, E.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Mito y realidades de la terapia antioxidante. Vimang. Nuevo producto natural antioxidante. CQF, *Centro de Química Farmacéutica*. Ministerio de Salud Pública. Ciudad de la Habana, Cuba, 2003.

MEDINA, J. C.; BLEINROTH, E. W.; MARTINS, Z. J.; QUAST, D. G.; HASHIZUME, T.; FIGUEREDO, N. M. S.; MORETTI, V. A.; CANTO, W. L.; BICUDO NETO, L. C. *Manga: da cultura ao processamento e comercialização*. ITAL. Série Frutas Tropicais, 8. Campinas: ITAL, 1981.

MOSES, S. N.; COLE, C.; DRISCOLL, I.; RYAN, J. D. Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Res Bull* [S.I.], v. 67, n. 1-2, p. 62-76, Set 2005.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; PAÉZ BETANCOURT, E.; AMARO GONZÁLEZ, D.; ACOSTA ESQUIJAROSA, J.; AGÜERO AGÜERO, J.; CAPOTE HERNÁNDEZ, R.; GÁRCIGA HERNÁNDEZ, M. R.; MORALES LACÁRRERE, I. G.; GARCÍA, O.; GARRIDO, G. G.; MARTINEZ SÁNCHEZ, G.; MORALES SEGURA, M. A. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. *Composiciones farmacéuticas a partir del extracto de Mangifera indica*. Patente No. 1814, Out 2002.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VELEZ-CASTRO, H. T.; AGUERO-AGUERO, J.; GONZÁLEZ, G. J.; NADEO, F.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J Agric Food Chem* [S.I.], v. 50, n. 4, p. 762-6, Feb 2002.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; GARRIDO, G. G.; GARCIA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCIA, M.; PARDO-ANDREU, G. L. The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 351-8, Maio 2007a.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; GARRIDO, G. G.; DELGADO, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; PARDO-ANDREU, G. L.; GARCIA-RIVERA D.; HERNÁNDEZ, P.; RODEIRO, I.; GUEVARA-GARCIA M.; ÁLVAREZ, A.; GARRIDO, B.; MIRANDA-LEYVA, R. Vimang®. Extracto de la corteza del árbol del mango (*Mangifera indica*). Un reto en la terapia antioxidante. CQF, *Centro de Química Farmacéutica*. Ministerio de salud publica, Ciudad de la Habana, Cuba, 2007b.

OROZCO, G.; ESTRADA, R.; PERRY, T. L.; ARANA, J.; FERNANDEZ, R.; GONZALEZ-QUEVEDO, A.; GALARRAGA, J.; HANSEN, S. Dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy from eastern Cuba. Clinical, neuropathological, and biochemical findings. *J Neurol Sci* [S.I.], v. 93, n. 1, p. 37-50, Out 1989.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; VELHO, J. A.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 439, n. 2, p. 184-93, Jul 2005a.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; VELHO, J. A.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 513, p. 47-55, 2005b.

PARDO-ANDREU, G. L.; SÁNCHEZ-BALDOQUÍN, C.; ÁVILA-GONZÁLEZ, R.; DELGADO, R.; NAAL, Z.; CURTI, C. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 547, n. 1-3, p. 31-6, Out 2006a.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VERCESI, A. E. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 53, n. 3, p. 253-60, Mar 2006b.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M. F.; CURTI, C.; HERNÁNDEZ, I.; MERINO, N.; LEMUS, Y.; MARTÍNEZ, I.; RIAÑO, A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 79-86, Jan 2008a.

PARDO-ANDREU, G. L.; PAIM, B. A.; CASTILHO, R. F.; VELHO, J. A.; DELGADO, R.; VERCESI, A. E.; OLIVEIRA, H. C. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 57, n. 5, p. 332-8, Maio 2008b.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. R.; FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Mangiferin, a

naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 635, n. 1-3, p. 124-8, Jun 2010a.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; FARIAS, C. B.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoxylxanthone, on fear memory in rats. *Arzneimittelforschung*, 2010b. Submitted.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4.ed. San Diego: Academic Press Inc., 1998. p. 31 il. amígdala e p. 37 il. hipocampo.

POURCEL, L.; ROUTABOUL, J. M.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci* [S.I.], v. 12, n. 1, p. 29-36, Jan 2007.

PULST, S. M. Spinocerebellar ataxia. In: PULST, S.M. (Ed.). *Genetics of movement disorders*. San Diego: Academic Press, p. 47-53, 2003.

RICHARDSON, P. M. The taxonomic significance of C-glycosylxanthones in flowering plants. *Biochem Systemat Ecol*, Abstract. v. 11, p. 371-5, 1983.

RIVERA, D. G.; BALMASEDA, I. H.; LEON, A. A.; HERNANDEZ, B. C.; MONTIEL, L. M.; GARRIDO, G. G.; CUZZOCREA, S.; HERNANDEZ, R. D. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *J Pharm Pharmacol* [S.I.], v. 58, n. 3, p. 385-92, Mar 2006.

SARKAR, A. ; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G. T.; MANNA, S. K. Beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 32, p. 33768-81, Ago. 2004.

SATO, T.; KAWAMOTO, A.; TAMURA, A.; TATSUMI, Y.; FUJII, T. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). *Chem Pharm Bull* [S.I.], v. 40, p. 721-4, 1992.

SCHÖLS, L.; BAUER, P.; SCHMIDT, T.; SCHULTE, T.; RIESS, O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* [S.I.], v. 3, n. 5, p. 291-304, Maio 2004.

SEQUEIROS, J.; SENECA, S.; MARTINDALE, J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of spinocerebellar ataxias. *Eur J Hum Genet* [S.I.], v. 18, n. 11, p. 1188-95, Nov 2010.

SINGH, V.; JAIN, D. K. *Taxonomy of Angiosperms* (2.ed.). India: Rastogi Publications, 2005-2006. p. 241.

VAN DE WARREMBURG, B. P.; SINKE, R. J.; VERSCHUUREN-BEMELMANS, C. C.; SCHEFFER, H.; BRUNT, E. R.; IPPEL, P. F.; MAAT-KIEVIT, J. A.; DOOIJES, D.; NOTERMANS, N. C.; LINDHOUT, D.; KNOERS, N. V. A. M.; KREMER, H. P. H.

Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* [S.I.], v. 58, n. 5, p. 702-8, Mar 2002.

VELÁZQUEZ-PÉREZ, L.; GARCIA, R.; SANTOS, F. N.; PANEQUE, H. M.; MEDINA, H. E.; HECHAVARRIA, P. R. [Hereditary ataxias in Cuba. Historical, epidemiological, clinical, electrophysiological and quantitative neurological features]. *Rev Neurol* [S.I.], v. 32, n. 1, p. 71-6, Jan 1-15 2001.

WAN, H.; AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 1142-8, Feb 1999.

WANG, H.; GUAN, Y. E.; CHUN-HUI, M. A.; TANG, Y. H.; FAN, M. S.; LI, Z. X.; PAUWELS ROGIERS, C. G. H. Identification and determination of four metabolites of mangiferin in rat urine. *J Pharm Biomed Anal* [S.I.], v. 45, n. 5, p. 793-8, Dez 2007.

YOSHIMI, N.; MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; QIAO, Z.; HARA, A.; YAMAHARA, J.; MORI, H. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Lett* [S.I.], v. 163, n. 2, p. 163-70, Feb 2001.

ZHENG, M. S.; LU, Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chin Med J* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 160-5, Feb 1990.

2 CAPÍTULO 2

O capítulo 2 trata dos estudos de atividades biológicas de valepotriatos, compostos do metabolismo secundário de plantas da família Valerianaceae Batsch (HOBBS, 1989). O interesse por estudar as ações farmacológicas de valepotriatos durante esse doutorado surgiu em decorrência da otimização da produção dessas moléculas em culturas *in vitro* de uma espécie de *Valeriana* endêmica do sul do país. Essas pesquisas são coordenadas por professores da Faculdade de Farmácia e do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ingressei ao grupo em 2000 para estágio de iniciação científica, permaneci durante toda a graduação, mestrado e mantive a colaboração no doutorado.

Esse capítulo está apresentado na forma de uma pequena revisão, seguida pelos dois artigos enfocando valepotriatos isolados de *V. glechomifolia* (nos quais constam introdução, procedimentos experimentais, resultados, conclusão e referências), bem como as referências bibliográficas consultadas no Capítulo 2.

Espécies de *Valeriana* são conhecidas há muitos séculos, devido às suas propriedades sedativas. Existem relatos da utilização dessa erva medicinal pelo menos desde o tempo da antiga Grécia e Roma. Seus usos terapêuticos foram descritos por Hipócrates, e, no século II, valeriana foi receitada por Galeno para insônia (NCCAM, 2009). As preparações de raízes de *V. officinalis* constituem um dos agentes fitofarmacêuticos mais utilizados no mundo, principalmente na Europa, e têm se tornado popular nos Estados Unidos (HOUGHTON, 1999; DEWICK, 2000; HERRERA-ARELLANO *et al.*, 2001; GARRARD *et al.*, 2003; BARNES *et al.*, 2004; CAVALIERE *et al.*, 2009). A Organização Mundial da Saúde considera que as preparações farmacêuticas obtidas a partir de *V. officinalis* podem ser utilizadas como alternativa aos benzodiazepínicos, sendo sua principal indicação como sedativo leve (OMS, 1999). Os benzodiazepínicos são conhecidos por serem

eficazes para a insônia, porém o benefício clínico é pequeno (cerca de uma hora de sono aumentada) e semelhante ao encontrado com a terapia do exercício (MORIN *et al.*, 1994). Além disso, a terapia crônica com benzodiazepínicos está associada a vários efeitos colaterais negativos, incluindo comprometimento cognitivo e aumento do risco de acidentes em veículos, quedas e fraturas (HOLBROOK *et al.*, 2000).

A família Valerianaceae contém cerca de 350 espécies no mundo (BELL e DONOGHUE, 2005), mas poucas são ou foram utilizadas medicinalmente (WHO, 1999). *V. officinalis* é a espécie mais encontrada em produtos comerciais, mas também existem relatos da utilização de *V. fauriei* (valeriana Japonesa) ("The Japanese pharmacopoeia XIII", 1996), *V. wallichii* ou *V. jatamansi* (valeriana Indiana) e *V. edulis* (valeriana Mexicana) (MORAZZONI e BOMBARDELLI, 1995).

Quanto à distribuição geográfica, subespécies de *V. officinalis* crescem em regiões temperadas e subpolares da Europa e da Ásia (HOBBS, 1989; WHO, 1999; NCCAM, 2009). A espécie é comum em matas úmidas, valas e ao longo de córregos na Europa; é cultivada como planta medicinal, especialmente na Bélgica, Inglaterra, Leste Europeu, França, Alemanha, Holanda, Rússia e nos Estados Unidos (BRUNETON, 1995), de onde é exportada para fins medicinais. O processamento para a produção de suplementos, incluindo raízes pulverizadas, extratos das raízes, óleos essenciais, tinturas e chás à base de valeriana tipicamente consiste de corte e secagem das partes subterrâneas da planta (raízes e rizomas). O uso de dióxido de carbono supercrítico (CO₂) para a produção de extratos de valeriana também foi descrito (ZIZOVIC *et al.*, 2007; DUAN *et al.*, 2009).

No Brasil, consta atualmente o registro de vinte e seis medicamentos fitoterápicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL. Anvisa, 2010) com o termo de busca valeriana (dois produtos registrados como extrato de *V. officinalis*, três produtos como extrato seco de *V. officinalis* e vinte e um produtos como *V. officinalis*), fitoterápicos simples ou associados. A Farmacopeia Brasileira preconiza a identificação pela presença de valepotriatos e o doseamento, pelo teor mínimo de 0,5% (de massa de valeriana seca) de óleos essenciais (BRASIL. Farmacopeia Brasileira IV, 1988). Os produtos comercializados têm sido padronizados geralmente em relação à concentração dos sesquiterpenos, tais como ácidos valerênicos (e seus derivados como o valeranal, o ácido acetoxivalerênico e o ácido hidroxivalerênico) (DEF, 2005/06; WILLS e SHOHET, 2009).

A Comissão E, um comitê científico da Alemanha responsável pela regulação de fitoterápicos e substâncias provenientes de plantas, aprova valeriana como um promotor do sono e agente sedativo para tratamento de agitação e distúrbios do sono causados pela ansiedade (BLUMENTHAL, 2000). Os fitoterápicos a base de valeriana são indicados e utilizados popularmente no tratamento de outras dissonias, convulsões infantis, agitação, tremores leves, e em condições de estresse psicológico, como a asma nervosa, estados histéricos, excitabilidade, hipocondria, neuralgia, epilepsia, transtornos de humor, como depressão, esclerose múltipla, dores de cabeça, enxaqueca e dor de estômago, síndrome da fadiga crônica, dores musculares e articulares, cólicas menstruais, sintomas da menopausa, hiperatividade gastrointestinal, com forte efeito antiespasmódico e antiarrítmico, hipotensivo, relaxante, vasodilador e fungicida (PETKOV, 1979; HAZELHOFF *et al.*, 1982; FUZZATI *et al.*, 1996; BACKLUND e MORITZ, 1998; HOUGHTON, 1999; DEWICK, 2000; GILANI *et al.*, 2005).

Muitos mecanismos de ação para as atividades biológicas de valerianas foram propostos, baseados em seus efeitos via receptores de GABA e de adenosina, como barbitúricos e benzodiazepínicos (MÜLLER, *et al.*, 2002; SCHUMACHER *et al.*, 2002; ORTIZ *et al.*, 2006). Acredita-se que as propriedades farmacológicas de alguns componentes de *V. officinalis* possam estar associadas com suas atividades antioxidantes ou citoprotetoras (MALVA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SUDATI *et al.*, 2009). Não existe concordância científica sobre o modo de ação sedativo ou os componentes ativos responsáveis pelos efeitos de valeriana (TESCH, 2003; DIETZ *et al.*, 2005; HATTESOHL *et al.*, 2008), apesar da ampla utilização e das investigações químicas e farmacológicas referentes à ação sedativa de *Valeriana* spp., sugerindo melhora nas propriedades, sem causar efeitos residuais significativos ou alteração da arquitetura do sono (HALLAM *et al.*, 2003; MEOLIE *et al.*, 2005).

A concentração e a constituição química das moléculas encontradas em valerianas e nos fitoterápicos a base de valeriana é bastante diversificada e varia amplamente de acordo com as características genótípicas e fenotípicas (entre as subespécies, variedades, idade da planta e com as condições ambientais), o tipo e a idade do extrato, os métodos de processamento e as condições de armazenamento vegetal (BECKER e SCHRALL, 1980; BOS *et al.*, 1998; WHO, 1999; GAO e BJÖRK, 2000; SINGH *et al.*, 2010). Mais de 150 compostos foram identificados nessas

plantas (HOUGHTON, 1999; HOBBS, 1989), os quais devem contribuir com a atividade no SNC. Na investigação da composição do óleo volátil de *V. officinalis* e *V. faueri* foram encontrados monoterpenos e sesquiterpenos, valepotriatos hidrofóbicos e ácidos valerênicos hidrofílicos, respectivamente (HOBBS, 1989; GRÄNICHER *et al.*, 1995; NISHYIA *et al.*, 1992; BOS *et al.*, 1996; TORI *et al.*, 1996). Pequenas quantidades de flavonoides, alcaloides, minerais, óleos voláteis e lignanas foram detectadas (HOBBS, 1989; BOS *et al.*, 1998; HOUGHTON, 1999; BOS *et al.*, 2002; SCHUMACHER *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2002; WASOWSKI *et al.*, 2002; MARDER *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

Valepotriatos

Os iridoides são encontrados em dicotiledôneas, sendo abundantes em certas ordens das simpétalas, tais como Dipsacales, na qual está incluída a família *Valerianaceae* (BELL e DONOGHUE, 2005). Esses compostos foram detectados em todas as espécies da família *Valerianaceae*, mas não em qualquer uma das outras famílias estudadas (BACKLUND e MORITZ, 1998).

As concentrações de valepotriatos variam muito entre as espécies: de 1,5 a 2% em *Valeriana officinalis*, 3% em *V. wallichii*, 7% em *V. mexicana* (HOBBS, 1989), sendo que a maioria dos produtos está concentrada nas raízes e rizomas (HOUGHTON, 1999). *V. glechomifolia in natura* produz cerca de 2% dos valepotriatos valtrato, isovaltrato, acevaltrato, diidrovaltrato e isovaleroxiidroxidiidrovaltrato, encontrados nas partes aéreas e subterrâneas (SALLES *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002).

Os valepotriatos (valeriana-epoxi-triesteres) são metabólitos do tipo iridoides não glicosilados, e suas variações estruturais devem-se aos diferentes substituintes ácidos esterificados com os grupos hidroxila, à presença ou ausência de um grupo epóxido e ao número e posição das ligações duplas no núcleo principal, dividem-se em dois grupos principais: monoênicos e diênicos (Figura 2.1) (HOBBS, 1989; BOS *et al.*, 2002).

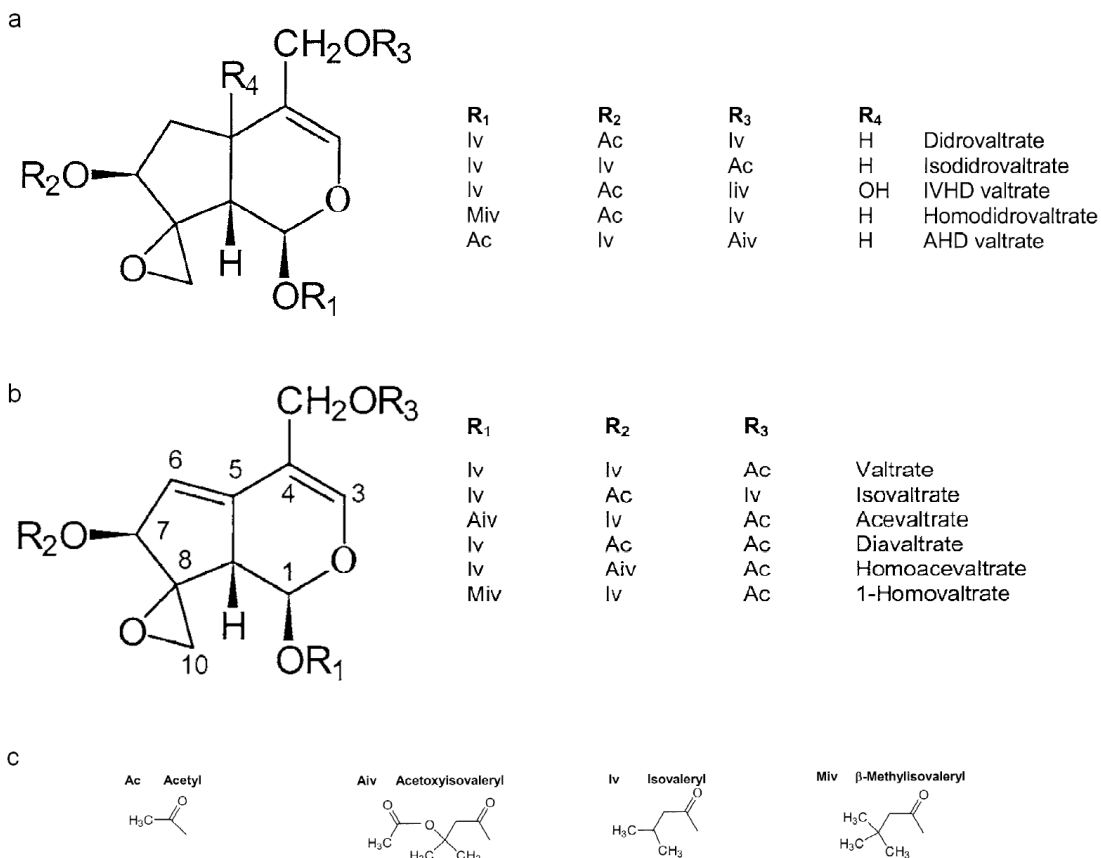


Figura 2.1: Estrutura molecular e nomenclatura de alguns valepotriatos. Em a) monoênicos, b) diênicos e c) radicais. Fonte: Bos *et al.* (2002)

Os valepotriatos são bastante instáveis devido à sua estrutura epóxido, sendo que as perdas ocorrem com bastante rapidez durante o armazenamento ou o processamento, especialmente se o material não é cuidadosamente seco (WHO, 1999). Os principais produtos de degradação são baldrinal, homobaldrinal e valtroxal (MORAZZONI e BOMBARDELLI, 1995), que são encontrados nos fitoterápicos a base de valeriana e podem ser responsáveis por grande parte do efeito sedativo (THIES e FUNKE, 1966; THIES, 1969; WAGNER, 1980; VEITH *et al.*, 1986). A hidrólise de valepotriatos durante o processo de secagem e armazenamento da planta resulta frequentemente na formação dos produtos de degradação aldeídos insaturados iridoides e dos ácidos correspondentes, como o isovalérico, que é responsável pelo odor característico, penetrante e desagradável das espécies de *Valeriana* (BOS *et al.*, 1996; BACKLUND e MORITZ, 1998), odor que se torna mais forte com o envelhecimento (British pharmacopoeia, 1988; European pharmacopoeia, 1995).

Existem controvérsias sobre quais as moléculas encontradas em espécies da família Valerianaceae são responsáveis pela atividade sedativa e/ou ansiolítica dos extratos de valeriana. Os mecanismos envolvidos nas atividades farmacológicas e terapêuticas de *V. officinalis* não estão esclarecidos (PATOČKA e JAKL, 2010). Dados da literatura têm indicado que um aumento na transmissão gabaérgica poderia ser responsável pelas propriedades terapêuticas do extrato desta planta (MENNINI *et al.*, 1993; CAVADAS *et al.*, 1995; HOUGHTON, 1999; ABOURASHED *et al.*, 2004). A *V. officinalis* exibiu atividade antioxidante em diferentes modelos *in vitro* (MALVA *et al.*, 2004; SUDATI *et al.*, 2009) e apresentou efeito citoprotetor em um modelo experimental *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Além disso, nenhum sinal de toxicidade do seu uso foi reportado (FACHINETTO *et al.*, 2007; TABACH *et al.*, 2009). Porém, nos diferentes estudos disponíveis sobre atividades biológicas de valerianas, existe bastante variação em relação ao tipo e à concentração de moléculas presentes nos extratos (AL-MAJED *et al.*, 2006).

No Brasil, foram descritas dezessete espécies de *Valeriana* (SAMPAIO *et al.*, 1993; SOBRAL, 1999a), com a ocorrência de doze no Rio Grande do Sul (SOBRAL, 1999a; 1999b; 1999c), sendo que duas espécies, *V. glechomifolia* e *V. tajuvensis*, encontram-se ameaçadas de extinção (BRASIL. Portaria Ibama, 1992). Dentre as nove espécies de *Valeriana* estudadas no sul do Brasil, em *V. glechomifolia* foram encontrados os maiores teores de valepotriatos (SALLES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002). Esses compostos foram detectados e quantificados tanto nas partes aéreas da planta *in natura* (1,57g% de massa seca, MS), como nas partes subterrâneas (0,47g% de MS) (SILVA *et al.*, 2002), diferentemente de outras espécies de *Valeriana*, em que o acúmulo dos iridoides é praticamente restrito às raízes (HOUGHTON, 1999), e a coleta acarreta morte da planta.

Não existem relatos da utilização terapêutica de *V. glechomifolia*. Ela é um arbusto de pequeno porte, com inúmeras pequenas folhas e raízes, que apresenta o hábito estolonífero e encontra-se em áreas elevadas, principalmente nas rochosas (SOBRAL, 1999a, SALLES *et al.*, 2000).

Os métodos de cultivo *in vitro* são amplamente utilizados para a propagação de um grande número de espécies de plantas (ROUT *et al.*, 2000). O interesse na obtenção e investigação das atividades biológicas de moléculas de espécies de *Valeriana* e a possibilidade de obtenção e maximização da produção desses compostos por meio da biotecnologia vegetal levou ao estudo de

procedimentos de plantio e estabelecimento de culturas de órgãos e tecidos (BECKER e SCHRALL, 1980; VIOLON *et al.*, 1984; MILKOVA *et al.*, 1988; MATHUR e AHUJA, 1991; GRÄNICHER *et al.*, 1992; MATHUR, 1992; GRÄNICHER *et al.*, 1995; ENCISO-RODRÍGUEZ, 1997; BANERJEE *et al.*, 1998; KAUR *et al.*, 1999; CASTILLO *et al.*, 2000; CASTILLO *et al.*, 2002; KITTIPONGPATANA *et al.*, 2002; MAURMANN, 2006; TOUSI *et al.*, 2010). Devido a muitos fatores, como a ocorrência de valepotriatos nas partes aéreas, a planta encontrar-se restrita a uma pequena região do sul do Brasil, estar ameaçada de extinção, a possibilidade de produção de matéria-prima e tecnologia nacional de importância biológica de espécies nativas e a redução do extrativismo predatório, grupos de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul têm estudado alternativas de cultivo *in vitro* para a propagação, a regeneração e o melhoramento de *V. glechomifolia*, bem como a otimização da produção de valepotriatos. Após o estabelecimento de plantas cultivadas assepticamente por Salles *et al.* (2002) (Figura 2.2a), foram realizados estudos de crescimento de plântulas tratadas com auxinas e aclimatação vegetal (de CARVALHO, 2003; de CARVALHO *et al.*, 2004, Figura 2.2b); fez-se o estabelecimento de culturas de plantas em meio líquido de cultura (RUSSOWSKI *et al.*, 2006a; 2006b, Figura 2.2c); o estabelecimento de culturas de calos, culturas de células em suspensão e culturas de raízes em meio líquido (MAURMANN *et al.*, 2006, Figura 2.2d) e protocolos de otimização da micropropagação das plântulas (MAURMANN *et al.*, 2008). Plântulas da espécie *V. glechomifolia* cultivadas *in vitro* apresentaram até cinco vezes maiores teores na quantificação de três valepotriatos majoritários, o valtrato, acevaltrato e diidrovaltrato (MAURMANN *et al.*, 2008).

Não existem relatos da síntese orgânica de análogos de valepotriatos.

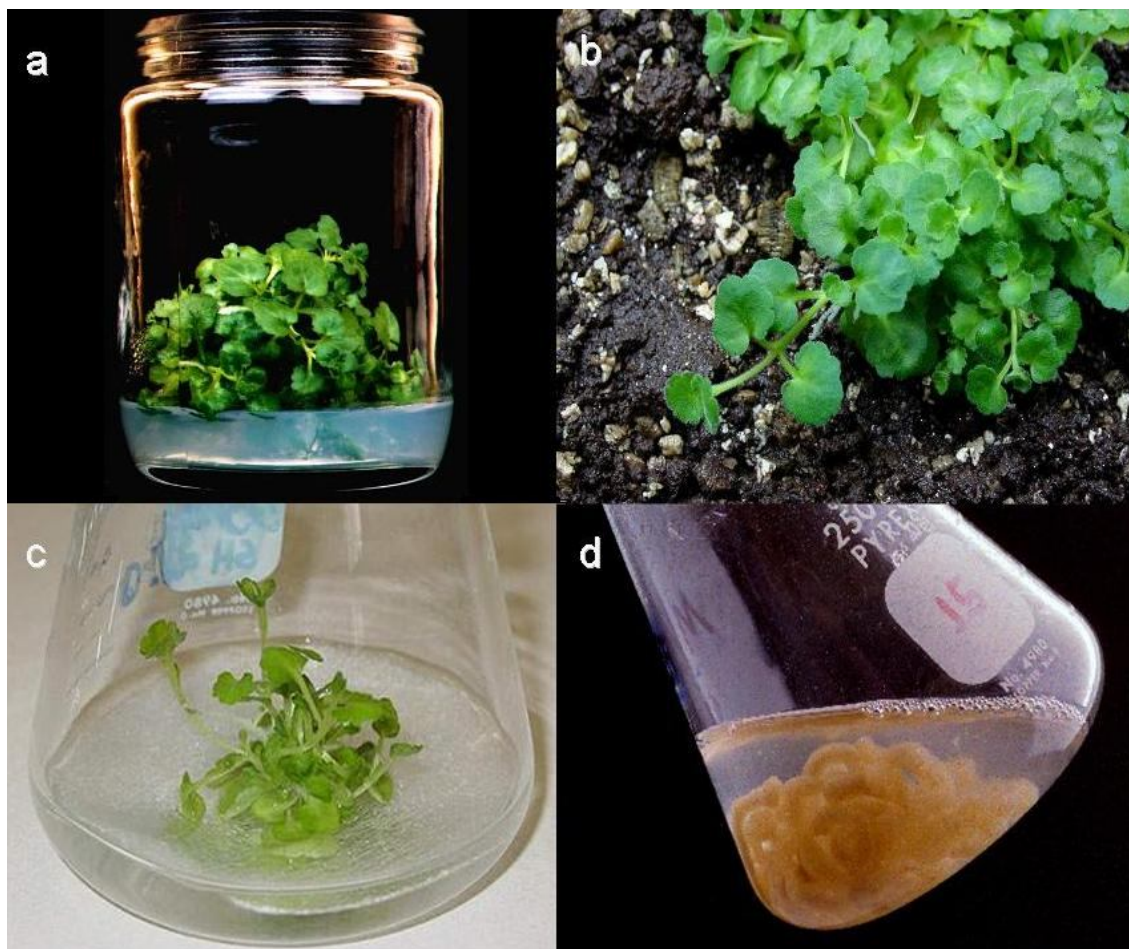


Figura 2.2: Aspecto de *Valeriana glechomifolia*. a) Plântula micropropagada em meio MΔ após 5 meses de cultivo. Fonte: Maurmann *et al.* (2007). b) Desenvolvimento das plantas após 45 dias de transplântio para o solo. Fonte: Carvalho (2003). c) Cultivo de plantas inteiras de *V. glechomifolia* transferidas para frasco erlenmeyer contendo meio líquido de cultivo. Fonte: Russowski (2006a). d) Culturas de raízes cultivadas em frasco erlenmeyer contendo meio líquido de cultura. Fonte: Maurmann *et al.* (2003)

Devido à facilidade de obtenção e à alta concentração de valepotriatos em *V. glechomifolia*, tanto nas partes aéreas quanto nas subterrâneas, realizamos estudos sobre as atividades biológicas dessas moléculas. Baseados em dados da literatura, em que os valepotriatos são citotóxicos (BOUNTHANH *et al.*, 1981), realizamos experimentos com ativadores da via da PKA em células tumorais *in vitro* (artigo 5), e, considerando que existem controvérsias em relação à atividade farmacológica no sistema nervoso central dos valepotriatos (MARDER *et al.*, 2003, PATOČKA e JAKL, 2010), realizamos experimentos *in vivo* (artigo 6).

2.1 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 5

Os valepotriatos valtrato, diidrovaltrato e o derivado baldrinal, isolados de *Valeriana wallichii*, foram identificados como agentes citotóxicos quando adicionados à cultura *in vitro* da linhagem celular de hepatoma de ratos e antitumorais *in vivo* no tumor ascítico de Krebs II (BOUNTHANH *et al.*, 1981). Valtrato apresentou praticamente 0% de células viáveis em um dia de tratamento; diidrovaltrato induziu 100% de mortalidade nessas células, na concentração de 66µg/ml, após a exposição durante 24h (BOUNTHANH *et al.*, 1981). Valtrato e diidrovaltrato inibiram a síntese de DNA nas células de hepatoma de rato cultivadas *in vitro* (BOUNTHANH *et al.*, 1983).

Hui-Lian *et al.* (2003) concluíram que as maiores concentrações testadas de um extrato diclorometânico de valeriana (40 a 60µg/ml) provocaram danos moderados no DNA em células endoteliais humanas ECV304, utilizando o ensaio Cometa após 48h de tratamento.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa avaliaram a viabilidade *in vitro* de células tumorais humanas U138-MG (glioma), HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e OVCAR (carcinoma ovariano) com extratos brutos e semipurificados padronizados obtidos de *Valeriana glechomifolia* cultivadas *in vitro*, demonstrando redução da viabilidade celular após 24h de exposição de valepotriatos nas doses de 23,12µg/ml, 46,25µg/ml, 92,50µg/ml, 185,00µg/ml e 370,00µg/ml, com perfis de inibição semelhantes nas diferentes linhagens, conforme ilustrado na Figura 2.3 (MARCHIORO, 2009).

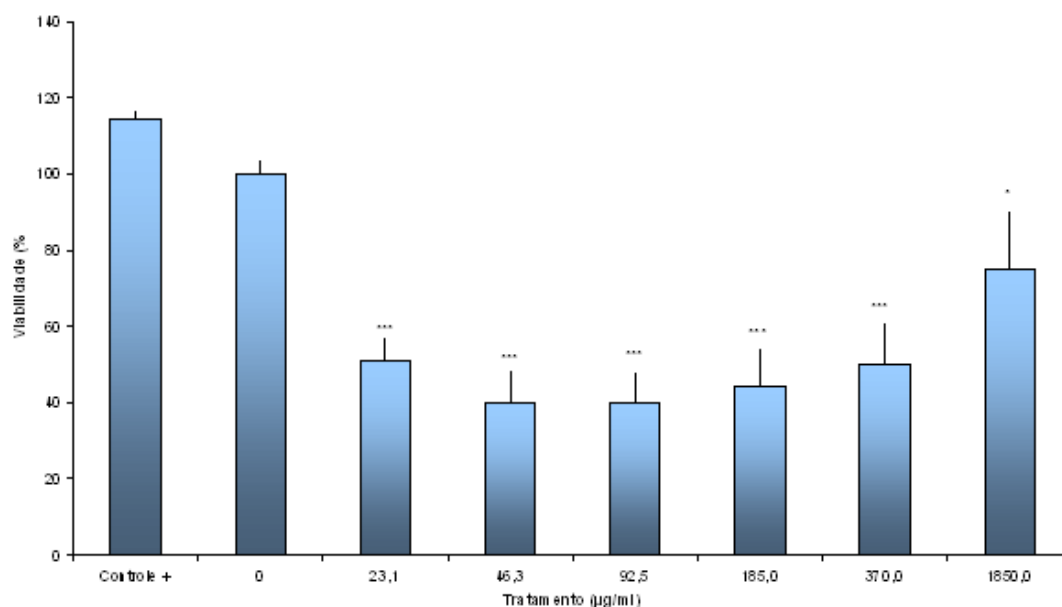


Figura 2.3: Viabilidade de células U138-MG após 24 horas de tratamento com extrato clorofórmico semipurificado de plantas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia*. * $P \leq 0,05$ e *** $P \leq 0,001$ indicam diferenças estatísticas significativas de redução da viabilidade em comparação ao controle. Controle + indica o meio sem o veículo etanol. Fonte: Marchioro, 2009

Para avaliação dos mecanismos moleculares de ação envolvidos na diminuição da viabilidade celular, nesse artigo estudamos o efeito de valepotriatos obtidos de *Valeriana glechomifolia* por meio da técnica de fluido supercrítico, combinado com estimuladores da via AMPc/PKA na proliferação de células U138-MG de glioblastoma humano.

A extração com fluido supercrítico (SFE, SC-CO₂) oferece diversas vantagens sobre os métodos convencionais de extração, tais como maior seletividade, automaticidade, segurança ambiental, menor utilização de solventes orgânicos, maior velocidade e melhor reprodutibilidade (HERRERO *et al.*, 2006). O dióxido de carbono – fluido supercrítico mais comumente usado como solvente – é quimicamente inerte, não tóxico e não inflamável (ESPINOSA *et al.*, 2000). Essas vantagens têm atraído um interesse crescente de pesquisadores, especialmente de Alimentos, Farmácia e Indústrias de Engenharia Ambiental. Para a extração por fluido supercrítico têm-se encontrado diversas aplicações no processamento de produtos naturais, nas últimas duas décadas, principalmente nos países da América do Sul, devido à sua rica biodiversidade (ROSA e MEIRELES, 2005).

Existem poucos estudos sobre a extração por SC-CO₂ em *Valeriana*. Alguns sesquiterpenos foram obtidos de raízes de *V. officinalis* (ZIZOVIC *et al.*, 2007; SAFARALIE *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Salles *et al.* (2010) descreveram a obtenção de valepotriatos de *V. glechomifolia*, metodologia que foi utilizada para obtenção dos valepotriatos nos experimentos descritos no artigo 5.

A família de proteínas quinase, abrangendo mais de 500 membros, representa um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de medicamentos. Por meio da fosforilação reversível, proteínas quinase participam de processos da transdução do sinal intracelular, tais como o metabolismo, a progressão do ciclo celular, a proliferação, a apoptose e a diferenciação. Assim, foi demonstrado o envolvimento de mais de 150 proteínas quinase no desenvolvimento de distúrbios e doenças humanas, especialmente a artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, imunodeficiências, doenças endócrinas, doenças neurodegenerativas e câncer (COHEN, 2001).

A desregulamentação de sinais das vias de transdução desempenha um papel importante no desenvolvimento do câncer (GIAMAS *et al.*, 2010). A via da PKA é importante em funções celulares, tais como motilidade, adesão, interação célula a célula, captação e transdução de sinais externos (KONDRASHIN *et al.*, 1999). Walter *et al.* (1977) descreveram o envolvimento de PKA na superfície externa de células de glioma de ratos, C6. Inibidores dessa via foram usados, resultando no aumento da proliferação celular da linhagem C6 (HELMBRECH e RENSING, 1999). Perry *et al.* (2004) relataram que a PKA parece estar relacionada à proliferação da linhagem celular U-87MG.

Tendo em vista que as proteínas quinase surgiram como principais reguladores dos aspectos de neoplasia, incluindo a proliferação, a invasão, a angiogênese e a metástase (BASELGA, 2006; GIAMAS *et al.*, 2007), no presente estudo avaliamos as interações entre a inibição produzida por valepotriatos e a sinalização mediada por AMPc/PKA, na linhagem celular de glioblastoma humano, U138-MG.

A AMPc (adenosina monofosfato cíclica) é um nucleotídeo cíclico que age como mensageiro secundário celular. A AMPc é produzida quando a proteína G ativa a adenilato ciclase na membrana plasmática. Esta enzima converte ATP em AMPc pela remoção de dois grupos fosfatos do ATP. Uma vez que a concentração intracelular de AMPc é elevada, esses nucleotídeos ativam a proteína quinase

dependente de AMPc (PKA) e são degradados pelas fosfodiesterases. A figura 2.4 ilustra o mecanismo de produção e degradação do AMPc nessa via celular.

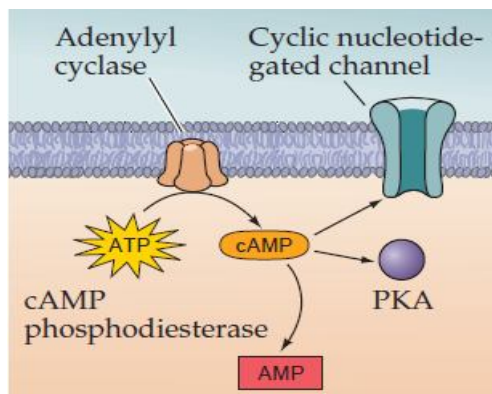


Figura 2.4: Mecanismo de produção e degradação da adenosina monofosfato cíclica. Abreviações: ATP = adenosina trifosfato; cAMP = adenosina monofosfato cíclica; AMP = adenosina monofosfato; Adenylyl cyclase = enzima adenilato ciclase; Cyclic nucleotide-gated channel = canal de nucleotídeo cíclico; cAMP phosphodiesterase = enzima fosfodiesterase que degrada AMPc; PKA = proteína quinase dependente de AMPc. Fonte: Purves *et al.* (2004)

Para estudar a via celular, utilizamos três ativadores da rota AMPc/PKA (forskolina, rolipram e 8-bromo-AMPc), descritos a seguir:

A forskolina (7 β -acetoxi-8,13-epóxi-1 α ,6 β ,9 α -trihidroxi-labd-14-en-11-one) é um diterpeno extraído da planta *Coleus forskohlii* que é permeável nas células e age estimulando a atividade da adenilato ciclase, por meio de uma interação direta com a subunidade catalítica da enzima (METZGER e LINDNER, 1981 *apud* PFEUFFER e METZGER, 1982; SEAMON e DALY, 1986 *apud* FLORIO *et al.*, 1999). Essa molécula também possui efeitos anti-hipertensivos e inotrópicos positivos, além de apresentar consequente aumento da concentração do AMP cíclica (AMPc) intracelular (FLORIO *et al.*, 1999).

O rolipram (4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidinona) é um inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo IV (PDE4), específica para degradação de AMPc (RAO e XI, 2009), produzindo acúmulo de cAMP (YAMASHITA *et al.*, 1997; MAXWELL *et al.*, 2004).

O 8-bromo-AMP cíclico (8-bromo adenosina-3',5'-monofosfato cíclico) é um análogo do AMPc permeável na célula, com maior resistência do que o AMPc à hidrólise pelas fosfodiesterases, tendo ação prolongada (HEI *et al.*, 1990).

Esta "short communication" será enviado para a revista Fitoterapia.

Artigo 5

Inhibition of U138-MG glioblastoma cells viability through valepotriates and the combination with agents that enhance cAMP signaling

Natasha Maurmann^{a,b,c}, Caroline B. de Farias^{a,c,d}, Gilsane Lino von Poser^e, Gilberto Schwartzmann^{a,f}, Rafael Roesler^{a,b,c}

^a *Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE/HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *National Institute for Translational Medicine (INCT-TM). Brazil*

^d *Children's Cancer Institute (ICI-RS) and Pediatric Oncology Service. Porto Alegre, RS, Brazil*

^e *Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil*

^f *Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil*

Keywords:

valepotriates – cAMP signaling – glioblastoma – brain tumor – MTT – rolipram – forskolin – 8-Br-cAMP

Inhibition of glioma cells viability assessed by valepotriates and cAMP/PKA

Abstract

Although valepotriates can inhibit cell viability, signal mechanisms remain unclear. The cAMP/protein kinase A (PKA) signaling pathway plays an important role in mediating mitogenic effects. We have evaluated the effects of valepotriates alone or in combination with stimulators of the cAMP/PKA pathway on proliferation of U138-MG human glioblastoma cells. All different doses of valepotriates used induced a

significant decrease in cell viability. In treatments in which valepotriates were combined with the adenylyl cyclase activator forskolin or the phosphodiesterase type IV inhibitor rolipram, the viability of U138-MG cells *in vitro* was not affected, measured by MTT assay. In this study we show that the combination of valepotriates (in all different doses administered) with the agent cAMP analog 8-Br-cAMP (that stimulate the cAMP/PKA pathway) enhances proliferation of human glioblastoma cells. Stimulation compounds showed no effects when administered alone. The results suggest that valepotriates interact with the cAMP/PKA signaling pathway in inhibition cancer cell proliferation.

Introduction

Plants in the Valerianaceae have been used as folk medicines for hundreds of years (Misawa, 1994). The use of valerian roots is a popular therapy for insomnia (BLUMENTHAL, 2000). The epoxy iridoid esters valepotriates, a group of secondary metabolites of valerian, present some biological activities, such as antispasmodic (HAZELHOFF *et al.*, 1982), antifungal (FUZZATI *et al.*, 1996), cytotoxic and antitumor (BOUNTHANH *et al.*, 1981; BOS *et al.*, 1998a), sedative and anxiolytic properties (MAURMANN *et al.*, 2010).

Bounthanh *et al.* (1981) tested valepotriates (valtrate and didrovaltrate) isolated from *Valeriana wallichii*, and baldrinal (a degradation product of valtrate) for their cytotoxic activity *in vitro*, using cultured hepatoma cells of rats. Valtrate was the most active compound in this system, causing the death of 100% of hepatoma cells after 24 hours incubated at a concentration of 33µg/mL. More detailed research showed that didrovaltrate presented cytotoxic activity when incubated at concentrations higher than 8µg/ml of culture and caused the death of 100% of cells after 24 hours of incubation at a concentration of 66µg/ml (BOUNTHANH *et al.*, 1981). In mice, the administration of intraperitoneal didrovaltrate led to a regression of Krebs II ascitic tumour, when compared with control (BOUNTHANH *et al.*, 1981).

In a subsequent *in vivo* study, in which valtrate was administered to mice (through intraperitoneal injection and orally), researchers did not report any toxic effects on haematopoietic precursor cells when compared with control groups (BRAUN *et al.*, 1984). The valepotriates are known to be unstable compounds in

both acidic and alkaline media. Also, it has been suggested that their *in vivo* toxicity is limited, due to poor absorption and/or distribution (BOS *et al.*, 1996).

The protein kinase family plays an important role in regulating various cellular processes (such as cell proliferation, cell death, cell cycle progression, differentiation and cell survival). Therefore, it is not surprising that the deregulation of many kinases is usually associated to cancer development (GIAMAS *et al.*, 2010).

The involvement of the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway remains controversial. Moreover, it is not clear whether cAMP signaling inhibits or stimulates glioma growth. Previous laboratory studies showed that gastrin-releasing peptide combined with stimulators of the cAMP/PKA signaling pathway enhances proliferation of U138-MG human glioblastoma cells *in vitro*; the same does not happen when it is administered alone (FARIAS *et al.*, 2008).

To address the question of whether the via cAMP/PKA activators reverse the effect of inhibiting the glioblastoma cells viability caused by valepotriates, we have evaluated the effects of valepotriates alone or combined with stimulators of the cAMP/PKA pathway (rolipram, forskolin and 8-Br-cAMP) on proliferation of U138-MG human glioblastoma cells.

Materials and Methods

Plant Material

Micropropagated plants of *Valeriana glechomifolia* Meyer-cultivated in modified Murashige & Skoog medium were collected after five months of *in vitro* culture (MAURMANN *et al.*, 2008). The plant material was freeze-dried and kept frozen.

Preparation of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extract of valerian

Supercritical extractions were carried out on pilot-scale automated equipment previously described (CASSEL *et al.*, 2007; SALLES *et al.*, 2010). Powdered plant material (80gDW) was used, and the extractions were conducted at a constant temperature condition (40°C). The extract of SC-CO₂ at 90bar was

collected for 40min. The supercritical carbon dioxide flowed at the rate of 6.67×10^4 kg/s through the extraction vessel that was supplied with a heating jacket and an automated temperature controller. Heating tapes were used throughout the apparatus to maintain constant temperature during the extraction section. To ensure constant and steady solvent delivery, the pump head was cooled by a circulating fluid, which passed through a chiller. Flow rates and accumulated gas volumes passing through the apparatus were measured using a flow meter assay, 1-300g/min. (Thar 06618-2, USA). Ke (USA) micrometering valves were used for flow control throughout the apparatus. Heating tapes with automated temperature control were also used around this valve to prevent the solvents from being frozen and the solid solute from precipitating after depressurization. The pressure in the extractor was monitored with a digital transducer system, Novus 8800021600 (Novus Produtos Eletrônicos, Brazil), with a precision of ± 1.0 bar. The temperature controller was connected to thermocouples (PT-100), with an accuracy of 0.5K.

Quantification of Valepotriates

High-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis of valepotriates was performed as previously described (SILVA *et al.*, 2002; MAURMANN *et al.*, 2010; SALLES *et al.*, 2010). The valepotriates (3x5mg) were dissolved in methanol and analyzed in a Shimadzu equipment, using a Nova-Pack C18 column and pre-column (Waters). The mobile phase was acetonitrile/water 50:50 (v/v), and the flow rate was 1ml/min.; detection was done at 254nm. The phytochemical analysis revealed that 1g of SC-CO₂ extract contained 273.53 ± 7.62 mg of valtrate, 202.28 ± 3.09 mg of acevaltrate, 137.56 ± 0.81 mg of 1- β -acevaltrate and 30.41 ± 0.88 mg of isovaltrate.

Cell Culture and Treatments

The U138-MG cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA). The cells were plated into 96 multiwell plates at a density of 4×10^3 cells per well, and grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, Calif., USA) containing 15% (v/v) fetal bovine serum (Soral, Campo Grande, Brazil). After 24h, the cultures were preincubated for 30min. with vehicle (5% ethanol), the adenylyl cyclase activator

forskolin (10 μ M; Fluka, St. Gallen, Switzerland), the cAMP analog 8-Br-cAMP (10 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) or the phosphodiesterase type IV inhibitor rolipram (10 μ M; Sigma-Aldrich) (FARIAS *et al.*, 2008). Valepotriates (10, 30 or 100 μ g/ml), isolated of *V. glechomifolia* by supercritical carbon dioxide or an equivalent volume of 5% ethanol in DMEM was then added to the plates, and cell viability was measured after 24h. Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95% and an atmosphere of 5% CO₂ in air (FARIAS *et al.*, 2008; ABUJAMRA *et al.*, 2009; MARCHIORO, 2009; SCHMITD *et al.*, 2009).

MTT Assay

Cell viability was measured by 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, Brazil), which measures the mitochondria activity, 24h after the treatment. To each well, it was added 11 μ l of MTT (5mg/ml solution) and then incubated for 4h at 37°C. The plate was left at room temperature until it was completely dry. Dimethyl sulfoxide was added and the absorbance was read in 492nm, in a multiplate reader (Spectra MAX 190) (MARCHIORO, 2009).

Statistics

Results are representative of 4 independent experiments performed in triplicate, and are expressed as mean + SEM percentage of the number of cells compared to control. Data were analyzed in a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the LSD *post hoc* test, using the SPSS program, version 16.0. Values of $P < .05$ were considered significantly different (FARIAS *et al.*, 2008; MARCHIORO, 2009).

Results

Valepotriates in combination with stimulators of the cAMP/PKA pathway inhibited viability of U138-MG glioblastoma cells

The results are shown in Figure 1. Valepotriates exhibit dose-dependent viability inhibition on U138-MG cells measured by MTT assay: 84.4% at valepotriates

10 μ g/ml ($P=0.04$), 77.5% at valepotriates 30 μ g/ml ($P=0.01$) and 60.4% at valepotriates 100 μ g/ml ($P=0.0001$) compared with control without valepotriates.

Combined treatment of valepotriates and forskolin or rolipram maintained viability inhibition (all P values ≥ 0.05 , compared within the same valepotriate dose). The 8-Br-cAMP reversed the effect of reduced viability in low doses.

None of the cAMP/PKA pathway stimulators significantly affected cell viability when given alone.

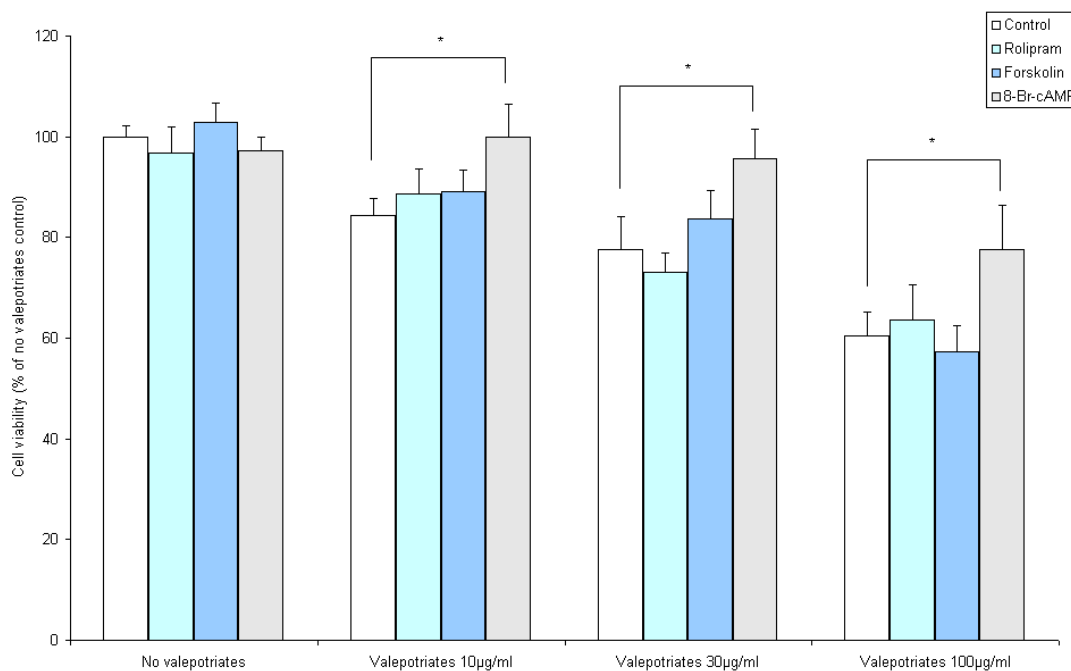


Figure 1: Valepotriates combined with stimulators of the cAMP/PKA signaling pathway in the proliferation of U138-MG human glioblastoma cells *in vitro*. Cells were treated with valepotriates (10, 30 or 100 μ g/ml), adenylyl cyclase activator forskolin (10 μ M), cAMP analog 8-Br-cAMP (10 μ M), phosphodiesterase type IV inhibitor rolipram (10 μ M), or valepotriates combined with forskolin, 8-Br-cAMP or rolipram. Cell viability was measured using MTT assay 24h after treatment, as described in Materials and Methods. Data represent the means + SEM of 4 different experiments performed in triplicate wells each. The mean value for control cells was taken as 100%. * $P \leq 0.05$

Discussion

Previous studies have not described interactions between valepotriates and modulators of cAMP signaling in glioma cells. Our results show that valepotriates combined with the 8-Br-cAMP activator of the cAMP/PKA signaling pathway enhance the proliferation of U138-MG cells *in vitro*, but the activators of the cAMP/PKA

signaling pathway forskolin and rolipram do not affect cell viability. None of the compounds present any effect when given alone at the concentrations used in this study.

The up regulation of the cAMP/PKA pathway by activators including forskolin, 8-Br-cAMP and rolipram has shown to decrease proliferation and to lead to apoptosis in the malignant glioma cell line A172 (CHEN *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2002). Moreover, stimulators of cAMP signaling inhibit, whereas PKA inhibition enhances proliferation of C6 glioma cells (HELMBRECHT *et al.*, 1999).

Our present report contrasts with those findings and suggests that, at least under some conditions (namely, co-inhibition with valepotriates), stimulation of the cAMP/PKA cascade by 8-Br-cAMP might promote proliferation of glioblastoma cells, rather than inhibiting it. Moreover, it has been demonstrated that stimulation of the cAMP/PKA pathway combined with GRP increased the viability in U138-MG glioblastoma cells (FARIAS *et al.*, 2008). These experiments suggest that activation of the cAMP/PKA pathway might stimulate proliferation of glioma cells, rather than inhibiting it.

The 8-Br-cAMP is a cAMP analogous exogenous with greater resistance to phosphodiesterases degradation than cAMP, which may be the reason why it reversed the cell inhibition viability caused by valepotriates. Both rolipram and forskolin act on enzymes that regulate the endogenous cAMP, while higher levels of these molecules can reverse the inhibition of viability, as well as 8-Br-cAMP.

Future experiments should examine if higher doses of rolipram and forskolin or different times can stimulate viability and/or prevent inhibitory effects of valepotriates in glioma cells.

Additional experiments are required to further examine the functional interactions between the valepotriates and cAMP signaling in different glioma cell lines and investigate the possible role of the valepotriates as a target for treating malignant gliomas.

Conclusions

The results of this study indicate that only the 8-Br-cAMP, activator of the cAMP/PKA pathway, combined with valepotriates, can induce opposite effects on the

viability of glioblastoma cells. In addition, the results indicate that the stimulation of the cAMP/PKA pathway promoted by the analogue 8-Br-cAMP, and not by the activators rolipram and forskolin, enhances the viability of these cells.

Acknowledgements

NM thanks for CAPES fellowship. This research was supported by the South American Office for Anticancer Drug Development (Porto Alegre, Brazil) and the Children's Cancer Institute (Porto Alegre, Brazil).

References

ABUJAMRA, A. L.; ALMEIDA, V. R.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biol Int* [S.I.], v. 33, n. 8, p. 899-903, Aug 2009.

BLUMENTHAL, M. Valerian root. In: BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. (Eds.). *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Newton, MA: Integrative Medicine Communications, p. 394-400, 2000.

BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; HENDRIKS, H.; ZWAVING, J. H.; DE SMET, P. A. G. M.; TITTEI, G.; WIKSTRÖM, H. V.; SCHEFFER, J. J. C. Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations. *Phytochem Anal* [S.I.], n. 7, n. 3, p. 143-51, May-Jun 1996.

BOS, R.; HENDRIKS, H.; SCHEFFER, J. J. C.; WOERDENBAG, H. J. Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine* [S.I.], n. 5, p. 219-25, 1998.

BOUNTHANH, C.; BERGMANN, C.; BECK, J. P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med* [S.I.], v. 41, n. 1, p. 21-8, Jan 1981.

BRAUN, R.; DITTMAR, W.; HUBNER, G. E.; MAURER, H. R. Influence of valtrate/isovaltrate on the hematopoiesis and metabolic liver activity in mice *in vivo*. *Planta Med* [S.I.], v. 50, n. 1, p. 1-4, Feb 1984.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BEDINOT, C. Unidad Piloto de Extracción Supercrítica Automatizada. In: CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. (Eds.). *Aplicaciones industriales de los taninos vegetales: productos y procesos*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 95-102, 2007.

CHEN, T. C.; HINTON, D. R.; ZIDOVETZKI, R.; HOFMAN, F. M. Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 165-74, Feb 1998.

CHEN, T. C.; WADSTEN, P.; SU, S.; RAWLINSON, N.; HOFMAN, F. M.; HILL, C. K.; SCHONTHAL, A. H. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram induces expression of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1), resulting in growth inhibition, increased differentiation, and subsequent apoptosis of malignant A-172 glioma cells. *Cancer Biol Ther* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 268-76, May-Jun 2002.

FARIAS, C. B.; LIMA, R. C.; LIMA, L. O.; FLORES, D. G.; MEURER, L.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* [S.I.], v. 75, n. 1-2, p. 27-31, Aug 2008.

FUZZATI, N.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; MSONTHI, J. D.; MAVI, S.; MOLLEYRES, L. P. Isolation and antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. *Phytochem Anal* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 76-85, Mar 1996.

GIAMAS, G.; MAN, Y. L.; HIRNER, H.; BISCHOF, J.; KRAMER, K.; KHAN, K.; AHMED, S. S.; STEBBING, J.; KNIPPSCHILD, U. Kinases as targets in the treatment of solid tumors. *Cell Signal* [S.I.], v. 22, n. 7, p. 984-1002, Jul 2010.

HAZELHOFF, B.; MALINGRE, T. M.; MEIJER, D. K. Antispasmodic effects of valeriana compounds: an in-vivo and in-vitro study on the guinea-pig ileum. *Arch Int Pharmacodyn Ther* [S.I.], v. 257, n. 2, p. 274-87, Jun 1982.

HELMBRECHT, K.; RENSING, L. Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurochem Res* [S.I.], v. 24, n. 10, p. 1293-9, Oct 1999.

MARCHIORO, M. K. *In vitro evaluation of antiproliferative activity of extracts of Valeriana glechomifolia*. Completion of course work. Course of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* [S.I.], n. 44, p. 209-215, 2008.

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; RECH, S. B.; FETT-NETO, A. G.; ROESLER, R. A Valepotriate Fraction of *Valeriana glechomifolia* Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], Jan 4 2010.

MISAWA, M. *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite*. Series title: FAO Agricultural Services Bulletin 1994- 108. Chapter 7 products of interest of industry, 1994.

SALLES, L.; NUNES, J. M.; CARGNIN, S.; BALADÃO, L. F.; RATES, S. M. K.; CASSEL, E.; VARGAS, R. F.; RECH, S. B.; VON POSER, G. L. Enrichment of valepotriates from *Valeriana glechomifolia* Meyer by supercritical fluid extraction. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, submitted 2010.

SCHMIDT, A. L.; DE FARIAS, C. B.; ABUJAMRA, A. L.; KAPCZINSKI, F.; SCHWARTSMANN, G.; BRUNETTO, A. L.; ROESLER, R. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* [S.l.], v. 40, n. 3, p. 303-10, Mar 2010.

SILVA, A. L.; RECH, S. B.; VON POSER, G. L. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to South Brazil. *Planta Med* [S.l.], v. 68, n. 6, p. 570-2, Jun 2002.

2.2 INTRODUÇÃO AO ARTIGO 6

Valepotriatos e ácidos valerênicos são geralmente considerados responsáveis pela ação sedativa de extratos de valeriana, embora a confirmação da atividade biológica não tenha sido claramente comprovada (BOS *et al.*, 1996; HOUGHTON, 1997; ANDREWS e BASU, 2005).

Como a atividade de valepotriatos no SNC é inconclusiva e os efeitos farmacológicos de *V. glechomifolia* não foram previamente examinados, realizamos a abordagem comportamental, testando a atividade ansiolítica e os efeitos na memória, em animais, de um extrato caracterizado em relação aos valepotriatos.

Dando continuidade aos experimentos iniciados durante o mestrado, avaliamos o efeito neurocomportamental (campo aberto, labirinto em cruz-elevado, reconhecimento de objeto e esquiva inibitória), em camundongos, de um extrato clorofórmico semipurificado de *Valeriana glechomifolia*, contendo 96% de valepotriatos. Este artigo foi publicado na revista "Evidence Based Complementary and Alternative Medicine" (e-CAM) e possui como título "A valepotriate fraction of *Valeriana glechomifolia* shows sedative and anxiolytic properties and impairs recognition but not aversive memory in mice".

Artigo 6

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2010, Article ID nep232, 7 pages
doi:10.1155/2010/nep232

Original Article

A Valepotriate Fraction of *Valeriana glechomifolia* Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice

Natasha Maurmann,^{1,2} Gustavo Kellermann Reolon,^{1,2} Sandra Beatriz Rech,³ Arthur Germano Fett-Neto,¹ and Rafael Roesler^{1,2}

¹ Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence should be addressed to Natasha Maurmann, natasha.maurmann@ufrgs.br

Received 14 August 2009; Accepted 1 December 2009

Copyright © 2010 Natasha Maurmann et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Plants of the genus *Valeriana* (Valerianaceae) are used in traditional medicine as a mild sedative, antispasmodic and tranquilizer in many countries. This study was undertaken to explore the neurobehavioral effects of systemic administration of a valepotriate extract fraction of known quantitative composition of *Valeriana glechomifolia* (endemic of southern Brazil) in mice. Adult animals were treated with a single intraperitoneal injection of valepotriate fraction (VF) in the concentrations of 1, 3 or 10 mg kg⁻¹, or with vehicle in the pre-training period before each behavioral test. During the exploration of an open field, mice treated with 10 mg kg⁻¹ of VF showed reduced locomotion and exploratory behavior. Although overall habituation sessions for locomotion and exploratory behavior among vehicle control and doses of VF were not affected, comparison between open-field and habituation sessions within each treatment showed that VF administration at 1 and 10 mg kg⁻¹ impaired habituation. In the elevated plus-maze test, mice treated with VF (10 mg kg⁻¹) showed a significant increase in the percentage of time spent in the open arms without significant effects in the number of total arm entries. VF at 3 mg kg⁻¹ produced an impairment of novel-object recognition memory. In contrast, VF did not affect fear-related memory assessed in an inhibitory avoidance task. The results indicate that VF can have sedative effects and affect behavioral parameters related to recognition memory.

1. Introduction

Complementary and alternative medicines (CAMs) have a long history of use for the treatment of sleep disorders [1]. The species of *Valeriana* are known for medical properties that date back to many centuries [2], and the herbal supplement valerian (*Valeriana officinalis*) is one of the most popular CAM therapies for insomnia [3, 4].

More than 100 constituents have been identified in *Valeriana* sp., including sesqui and monoterpenes (hydrophilic valerenic acids and the hydrophobic valepotriates, resp.), which may account for the activity in the central nervous system [2]. Valepotriates are iridoids with a cyclopenta(c)pyranoid skeleton, an epoxy ring and

three ester linkages, without glycosidic linkages [5], and controversial pharmacological activity [6]; their degradation products, valtroxal, 8,9-didehydro-7-hydroxy-dolichodial, 11-ethoxyviburtinal and baldrinal may account for valerian's effect [7]. Although several clinical studies revealed sleep-improvement properties, there is no scientific agreement on the sedating mode of action or the active constituents responsible for the valerian effects [2, 3, 8, 9].

Valeriana glechomifolia Meyer is an herb that grows in a restricted area of southern Brazil, and is not currently used as a phytomedicine. This plant accumulates valepotriates, both in shoots (1.57 g% DW) and roots (0.47 g% DW) [10]. As an alternative to the extraction of field-grown plants of *V. glechomifolia* for studies on pharmacological properties of

the species, we developed *in vitro* propagation protocols and studied the kinetics of growth and valepotriate production in aseptically cultivated plants [11–13].

The activity of valepotriates in the central nervous system remains inconclusive and the pharmacological effects of *V. glechomifolia* have not been examined yet. Therefore, a detailed behavioral and memory analysis of the effect of a valepotriate extract fraction of known quantitative composition from this species was carried out in mice model to evaluate locomotion (open field), anxiety (elevated plus maze), aversive memory (inhibitory avoidance) and declarative memory (object recognition).

2. Methods

2.1. Plant Material. *Valeriana glechomifolia* Meyer plants were collected in the region of Aparados da Serra, near the city of São Jose dos Ausentes (28°44'54" south and 50°03'57" west), state of Rio Grande do Sul, Brazil, in the autumn. The species was identified by Dr M. Sobral and a voucher specimen (Sobral, 7733) is deposited at the Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN). The plants were frozen, lyophilized, powdered and stored in freezer.

2.2. Preparation of Chloroform Extract of Valerian. Lyophilized shoots and roots of the plant were crushed to a particle size <850 µm. Approximately 100 g (dry weight) was extracted twice with 500 mL of chloroform for 15 min using a sonication bath (Ultrasonic). The extract was filtered through a glass filter and evaporated to dryness in vacuum at 40°C, yielding 4.21 g of extract.

2.3. Preparation of Semi-Purified Valepotriate Fraction. To further purify the valepotriate fraction (VF), the dried extract was separated by silica gel vacuum column chromatography with a hexane:chloroform gradient. The fraction containing valepotriates was monitored by preparative thin-layer chromatography (TLC) with chloroform:methanol (50:0.5) as eluent [10]. The VF was concentrated and used in the behavior tests.

2.4. Quantification of Valepotriates. High-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis of valepotriates in the VF was performed as previously described [10]. The VF (3 × 5 mg) was dissolved in methanol and analyzed in a Shimadzu equipment, using a Nova-Pack C18 column and pre-column (Waters). The mobile phase was acetonitrile/water 50:50 (v/v), and the flow rate 1 mL min⁻¹; detection was done at 208 nm (didrovaltrate, retention time of 19.8 min) and 254 nm (acevaltrate, retention time of 18.1 min and valtrate, 34.8 min) [10–14]. The valepotriates used as external standards were isolated as described elsewhere [10] and the identity and purity of the compounds were confirmed by nuclear magnetic resonance (¹H NMR) [14]. The spectral data were identical to those reported in the literature [15]. The phytochemical analysis revealed that the VF contained 96% of valepotriates (5 mg of VF contained 2.05 ± 0.11 mg of

didrovaltrate, 1.66 ± 0.05 mg of valtrate and 1.10 ± 0.01 mg of acevaltrate).

2.5. Animals. Swiss male CF1 mice (60–90 days old with mean body weight of 36.18 ± 3.41 g) obtained from the State Foundation for Production and Research in Health (FEPPS), Porto Alegre/Rio Grande do Sul/Brazil, were used in the pharmacological assays. Each group consisted of 8–10 animals, kept on a 12 h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. Behavioral procedures were conducted between 11 a.m. and 6 p.m. Experimental procedures were performed in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (European Treaty Series—No. 170 revised 2005) and the procedures of the Brazilian College of Laboratory Animals (COBEA). The experimental protocols were approved by the institutional research ethics and animal care committee (document number GPPG-HCPA 05–519). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

2.6. Drugs and Pharmacological Procedures. The VF was suspended in saline with Tween-80, 5.0% (v/v). Fresh solutions were prepared each time and intraperitoneally injected in a volume of 10 mL kg⁻¹ body weight at the doses of 1, 3 or 10 mg kg⁻¹; the control mice were injected with vehicle. A well-established positive control of elevated plus maze, diazepam intraperitoneal (i.p.) injection (1 mg kg⁻¹, obtained from DEG Imp. de Produtos Químicos Ltda, Brazil) was also examined in this task. VF injections were given 30 min before the elevated plus maze and 30 min before each training of the behavioral test.

2.7. Open-Field Behavior. The open-field exploration was carried out as previously described [16]. The open field was a 50 × 25 cm arena, surrounded by 50 cm high walls, and made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed on the left rear quadrant and left to freely explore the arena for 5 min. Latency to start locomotion, crossings of the black lines, rearings performed and the number of fecal pellets were counted. The numbers of crossings and rearings were used as measures of locomotor activity and exploratory behavior, respectively, whereas the latency to start locomotion and the number of fecal pellets were used as indicators of anxiety. After 24 hours, animals were left to explore the apparatus again for another 5 min, and the same measures were recorded to evaluate habituation memory to the open field.

2.8. The Elevated Plus-Maze Test. The elevated plus maze used in this study was modified from Lister [17]. The apparatus, elevated 45 cm from the floor, consisted of two open arms (30 × 6 cm) opposite to one another and crossed at right angles by two enclosed arms (30 × 6 × 15 cm) with an open roof. Anxiolytic compounds selectively increase the percentage of time spent and/or arm entries in the open arms; in contrast, anxiogenic compounds selectively decrease

the percentage of time spent and/or arm entries in the open arms. The number of entries and the total time spent in each of the two arm types were taken during a 5-min test period after the mice had been placed in the center of the maze 30 min following VF, diazepam or vehicle administration.

2.9. Novel Object Recognition. The novel object recognition task was performed as previously described [16]. Object recognition training and test trials took place in the same arena used for the open field. After 24 hours of a 5-min arena habituation session, the mice were trained in the novel object recognition task. Training was conducted by placing individual animals for 5 min into the arena, in which two identical objects (objects A1 and A2; Lego Duplo toys) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. In a long-term memory retention test given 24 hours after training, the same mice explored the field for 5 min in the presence of familiar object A1 and a novel object B. All objects presented similar textures and sizes, but distinctive colors and shapes. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. The exploratory preference was defined as the percentage of the total exploration time that the animal spent investigating object A2 (in the training) or the novel object.

2.10. Inhibitory Avoidance. The step-down inhibitory avoidance apparatus and procedures were described in previous studies [16]. The inhibitory avoidance training box was a $50 \times 25 \times 25$ cm acrylic box whose floor consisted of parallel stainless-steel bars. A platform ($10 \times 10 \times 2$ cm) was placed on the center of the floor. In the training trial, animals were placed on the platform, and their latency to step-down on the grid with all four paws was recorded. Immediately after stepping down on the grid, animals were given a 0.6 mA/3 s footshock. In the retention test session carried out 24 hours after training, no footshocks were given on test and a ceiling of 180 s was imposed in the test latency.

2.11. Statistical Analysis. Open field, habituation, elevated plus maze and novel object recognition data were expressed as mean \pm standard error. Data for inhibitory avoidance were expressed as median + interquartile range of step-down latencies. Comparisons among groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD (parametric data) or Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *U* (non-parametric data) tests when necessary. Comparisons between behavioral trials within the same group (comparisons between open-field behavior session and habituation session in the open-field test, comparisons between training and test sessions in the novel object recognition and in the inhibitory avoidance) were done by Wilcoxon test. *P*-values of $<.05$ were considered to indicate statistical significance. Statistical analyses were performed using the statistical software package SPSS.

3. Results

3.1. Open-Field Behavior and Open-Field Habituation. The results showed that there were no significant differences among groups in the latency to start locomotion in open-field sessions ($F(3,36) = 2.35, P = .09$; Figure 1(a)), or number of fecal pellets ($F(3,36) = 1.65, P = .20$; Figure 1(b)). However, mice treated with VF at 10 mg kg^{-1} showed significantly lower numbers of crossings ($F(3,36) = 2.95, P = .046$; Figure 1(c)) and rearings ($F(3,36) = 3.09, P = .039$; Figure 1(d)), which indicate alterations in locomotion and reduced exploratory behavior, compared with the control animals.

Results for open-field habituation session, 24 hours after the first open-field exploration session, are shown in Figure 1. There were no significant differences among groups in the latency to start locomotion ($F(3,36) = 1.57, P = .21$; Figure 1(a)), number of fecal pellets ($F(3,36) = 2.32, P = .09$; Figure 1(b)), number of crossings ($F(3,36) = 1.43, P = .25$; Figure 1(c)) or number of rearings ($F(3,36) = 1.23, P = .31$; Figure 1(d)), indicating no alterations in locomotion and reduced exploratory behavior in the habituation session, compared with the control animals.

For addressing the habituation process of the open-field experiment (Figure 1) in a more specific way, Wilcoxon tests were applied between sessions of the same treatment. These tests showed the expected significant decrease in the number of rearings during habituation session in the control mice treated with vehicle ($P = .008$). This profile was maintained in mice that received 3 mg kg^{-1} of VF ($P = .038$). However, mice treated with 1 mg kg^{-1} of VF showed no difference in the rearings ($P = .767$), whereas those treated with VF 10 mg kg^{-1} ($P = .037$) displayed an increased number of rearings during the habituation session, indicating an impairment in the habituation process. Control mice also showed the expected significant decrease in the latency to start locomotion ($P = .036$), a response that was not observed in any of the VF concentrations. The highest doses of VF (3 and 10 mg kg^{-1}) caused mice to produce more fecal pellets ($P = .035$ and $.039$, resp.), indicating increased anxiety in the habituation session (24 hours after VF administration).

3.2. The Elevated Plus-Maze Test. Mice treated with 10 mg kg^{-1} VF or diazepam at 1 mg kg^{-1} showed a significant increase in the percentage of time spent in the open arms when compared with control mice ($F(3,36) = 2.729, P = .032$ and $.014$, resp.; Figure 2). In addition, animals treated with diazepam also showed increased total number of arm entries ($F(3,36) = 5.31, P = .001$), whereas the VF treatments did not affect this exploratory behavior significantly (VF $1, 3$ and 10 mg kg^{-1} ; $P = .219, .818$ and $.235$, resp.). There was no significant difference among VF treatments in the number of open-arms entries on the elevated plus-maze test ($F(3,36) = 0.315, P = .814$).

3.3. Novel Object Recognition. Results for the effects of the VF administration on memory assessed in the novel object

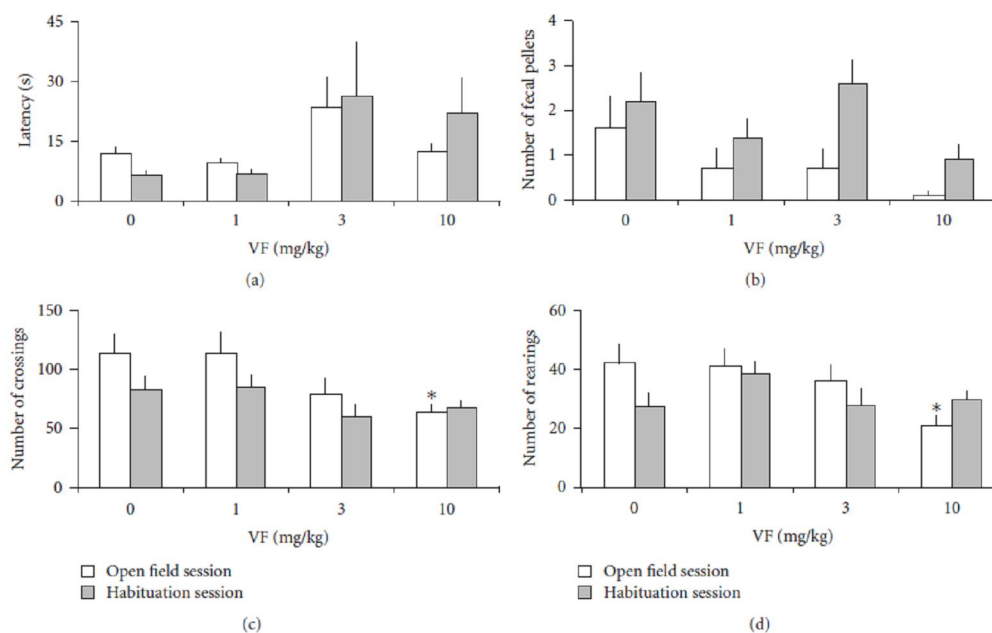


FIGURE 1: Open-field behavior and habituation in mice treated with a systemic administration of VF (1, 3 or 10 mg kg⁻¹) of *V. glechomifolia* 30 min before the first open-field exploration session. Animals were left to freely explore the arena for 5 min day⁻¹ during 2 days. Data are mean \pm SEM. (a) Latency to start locomotion (s), (b) number of fecal pellets, (c) number of crossings and (d) number of rearings. $n = 10$ animals per group. * $P < .05$, significant difference from the control group.

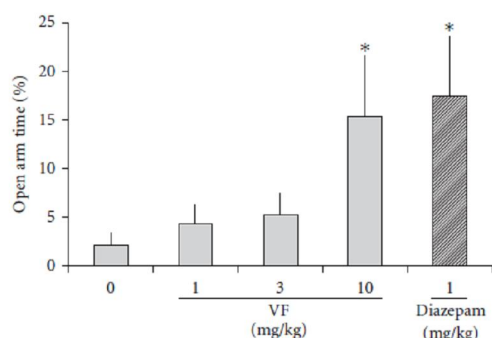


FIGURE 2: Elevated plus-maze behavior in mice treated with a systemic administration of VF (1, 3 or 10 mg kg⁻¹) of *V. glechomifolia* 30 min before behavioral testing. Animals were left to freely explore the apparatus for 5 min. The following parameter is shown: percentage open-arm time (percentage of time spent in open arms with respect to total time spent in the arms). Data are mean \pm SEM. $n = 10$ animals per group. * $P < .05$, significant difference from the control group.

both objects during training ($F(3,36) = 1.61, P = .21$), indicating that all groups showed similar locomotion and motivation during task acquisition. Mean \pm SE total exploration time (s) was 80.9 ± 7.2 (control), 87.4 ± 7.9 (VF, 1 mg kg⁻¹), 63.3 ± 7.8 (VF, 3 mg kg⁻¹), and 70.6 ± 11.2 (VF, 10 mg kg⁻¹). There was no significant difference between groups in exploratory preference in the training trial ($F(3,36) = 1.30, P = .29$). Moreover, there was a significant difference among groups in exploratory preference during test ($F(3,36) = 4.37, P = .01$). Further analysis revealed a significant difference between the control group and the group given VF at 3 mg kg⁻¹ in long-term recognition memory retention tested 24 hours after training ($P = .008$). These findings indicate that pretraining systemic administration of VF at the dose of 3 mg kg⁻¹ produced an impairment of novel object recognition memory.

Wilcoxon tests showed a significantly higher novel object exploratory preference in the VF at dose of 10 mg kg⁻¹ ($P = .017$). The vehicle and VF 1 mg kg⁻¹ treated group fell short of significance ($P = .069$ and $.066$, resp.) and there was no significant difference among training and test at VF 3 mg kg⁻¹-treated group ($P = .515$).

recognition task are shown in Figure 3. There were no differences among groups in the total time spent exploring

3.4. *Inhibitory Avoidance.* Results for inhibitory avoidance are shown in Figure 4. In all groups, there were significant training-test differences (Wilcoxon test, $P < .05$). There

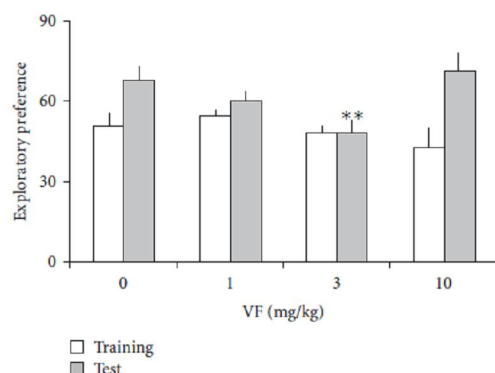


FIGURE 3: Novel object recognition memory in mice treated with a systemic administration of VF (1, 3 or 10 mg kg⁻¹) of *V. glechomifolia* 30 min before the training. Memory retention was tested 24 hours after training. Data are mean \pm SEM exploratory preferences during training (light columns) or test (dark columns) trials. Exploratory preference was defined as percentage time exploring object A2 during training or percentage time exploring the novel object B during test trials. $n = 8$ animals per group. ** $P < .01$, significant difference from the control group.

were no significant differences among groups in step-down latencies in the training trial ($H = 1.34$, $df = 3$, $P = .72$; mean \pm SEM overall training trial step-down latencies was 14.69 ± 1.65 s). In addition, there was no significant difference between groups in long-term memory retention carried out 24 h after training when compared with the control group ($H = 0.13$, $df = 3$, $P = .99$). The results indicate that VF did not affect inhibitory avoidance memory.

4. Discussion

Valeriana sp. contain several compounds including essential oils, terpenoids and small amounts of flavonoids, alkaloids and minerals [2, 5, 6]. Previous studies have reported the effect of higher polarity extracts (such as hydroalcoholic extracts) on the central nervous system [4, 6]. Studies with non-humans tend to support valerian as a central nervous system depressant [18]. Neurobiological mechanisms have been postulated to mediate its sedative and hypnotic effects, including binding studies for gamma-amino butyric acid (GABA) [18, 19], serotonergic [8, 20], dopaminergic and noradrenergic [18] and A1 adenosine [18, 21] receptors effects.

Although valerian is used traditionally as a mild sedative, research is sparse, and studies differ greatly with respect to design, measures and preparations used [22]. The role of valepotriates is considered somewhat controversial [6]. In this study, the extract containing 96% of valepotriates of *V. glechomifolia* at 10 mg kg⁻¹ was effective in reducing locomotion and exploratory behavior during open-field exploration in mice, which is indicative of sedative properties. This concentration also increased the time spent on the open arms,

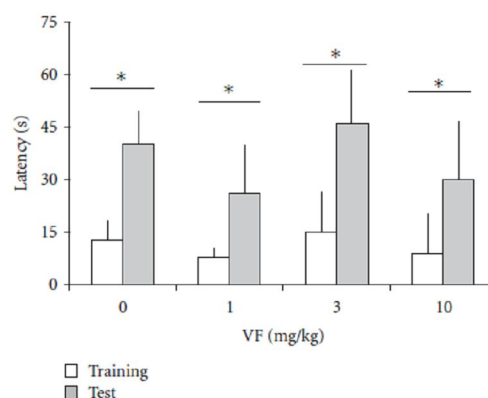


FIGURE 4: Fear-related memory assessed in an inhibitory avoidance task in mice treated with a systemic administration of VF (1, 3 or 10 mg kg⁻¹) of *V. glechomifolia* 30 min before training. Memory retention was tested 24 h after training. Data are median + interquartile range. Latencies to step-down (s) of training (light columns) or test (dark columns). $n = 9$ animals per group. There were no significant differences among groups, either in the training trial or in the test. Asterisks indicate groups showing significant training-test differences (Wilcoxon test, $P < .05$).

an indicative of anxiolytic property in the elevated plus-maze test, a well-established rodent model of anxiety [23]. However, unlike diazepam (1 mg kg⁻¹), VF (10 mg kg⁻¹) did not alter open-arm entries and total arm entries, but affected the time in closed arms. The effect is dose dependent, with lower doses of VF having no influence. Moreover, this dose did not affect the memory tests, compared with control animals. One possible interpretation for the lack of effect of VF 10 mg kg⁻¹ on the number of arm entries is partial locomotion impairment as observed in Figure 1(c). However, low doses of diazepam are known to induce increase in locomotion and number of arm entries [23, 24], which may also have contributed to this result.

Neither object exploration during training in a novel object recognition task nor inhibitory avoidance performance was affected by VF, whereas 24h retention of recognition memory was impaired by a lower dose of VF that did not affect locomotion or exploration. Thus, a lower dose of VF can selectively affect formation of recognition memory without inducing overt non-specific effects on other behavioral parameters.

It is interesting to note that the VF effect that impaired novel object recognition memory at the dose of 3 mg kg⁻¹ was not observed at the lower 1 mg kg⁻¹ and higher 10 mg kg⁻¹ doses. Previous studies evaluating the effects of injections of both memory enhancing [25] and memory impairing [26] drugs on memory show that several treatments produce an inverted-U dose-response curve [27].

This is the first study, to our knowledge, that shows the neuropharmacological profile of an enriched VF from *V. glechomifolia*, and the effect of this valepotriate extract

in memory. Obviously, a crude extract may have different activity due to the presence of additional compounds and interactions, which was not evaluated in the present work because the focus was on valepotriates, the major phytochemical components in this species. In addition, valerian-based herbal medicines are usually taken orally, an intake route through which valepotriates are poorly absorbed, even though some of their catabolites, such as baldrrinal, may remain available [7]. I.p. injections as employed in the present study may considerably change bioavailability compared with oral intake, which may affect the observed activity. However, i.p. injections were used to provide homogeneous applications and to maximize bioavailability of valepotriates, the phytochemicals evaluated in this first investigation of pharmacological properties of *V. glechomifolia*.

In summary, the present study indicates that systemic administration of VF from *V. glechomifolia* has sedative properties and can induce alterations in recognition memory and in the elevated plus-maze behavior in mice. Further research is required to examine the neurochemical mechanisms involved in the behavioral effects.

Funding

Brazilian federal research funding organizations: Coordination of Improvement of Higher Education (CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- [1] N. S. Gooneratne, "Complementary and alternative medicine for sleep disturbances in older adults," *Clinics in Geriatric Medicine*, vol. 24, no. 1, pp. 121–138, 2008.
- [2] M. Blumenthal, "Valerian root," in *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*, M. Blumenthal, A. Goldberg, and J. Brinckmann, Eds., pp. 394–400, Integrative Medicine Communications, Newton, Mass, USA, 2000.
- [3] D. M. Taibi and C. A. Landis, "Valerian and other CAM botanicals in treatment of sleep disturbances," in *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population. An Evidence-Based Approach*, R. R. Watson, Ed., pp. 57–81, Academic Press, Tucson, Ariz, USA, 2008.
- [4] Sleep Disorders and CAM: At a Glance, "U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health. National Center for Complementary and Alternative Medicine # 7. 2009," November 2009, <http://nccam.nih.gov/health/sleep/D437.pdf>.
- [5] R. Bos, H. J. Woerdenbag, F. M. S. Van Putten, H. Hendriks, and J. J. C. Scheffer, "Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines," *Planta Medica*, vol. 64, no. 2, pp. 143–147, 1998.
- [6] M. Marder, H. Viola, C. Wasowski, S. Fernández, J. H. Medina, and A. C. Paladini, "6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 75, no. 3, pp. 537–545, 2003.
- [7] J. Veith, G. Schneider, B. Lemmer, and M. Willems, "The effect of degradation products of valepotriates on the motor activity of light-dark synchronized mice," *Planta Medica*, vol. 52, pp. 179–183, 1986.
- [8] B. M. Dietz, G. B. Mahady, G. F. Pauli, and N. R. Farnsworth, "Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT 5a receptor *in vitro*," *Molecular Brain Research*, vol. 138, no. 2, pp. 191–197, 2005.
- [9] M. Hattesoehl, B. Feistel, H. Sievers, R. Lehnfeld, M. Hegger, and H. Winterhoff, "Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties," *Phytomedicine*, vol. 15, no. 1-2, pp. 2–15, 2008.
- [10] A. L. Silva, S. B. Rech, and G. L. Von Poser, "Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to South Brazil," *Planta Medica*, vol. 68, no. 6, pp. 570–572, 2002.
- [11] C. M. B. de Carvalho, N. Maurmann, D. I. Luz, A. G. Fett-Neto, and S. B. Rech, "Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*," *Plant Cell Reports*, vol. 23, no. 4, pp. 251–255, 2004.
- [12] N. Maurmann, C. M. B. De Carvalho, A. L. Silva, A. G. Fett-Neto, G. L. Von Poser, and S. B. Rech, "Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*," *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, vol. 42, no. 1, pp. 50–53, 2006.
- [13] D. Russowski, N. Maurmann, S. B. Rech, and A. G. Fett-Neto, "Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 86, no. 2, pp. 211–218, 2006.
- [14] L. Salles, *Phytochemical study and establishment of callus cultures of Valeriana glechomifolia Meyer* (Estudo Fitoquímico e estabelecimento de culturas de calos de *Valeriana glechomifolia Meyer*), M.S. thesis, Pharmacy School, Federal University of Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, 1999.
- [15] J. Hölzl and U. Koch, "The compounds of *Valeriana alliariifolia*. I: 1- β -acevaltrate, a new valepotriate (Über die Inhaltsstoffe von *Valeriana alliariifolia*. I: 1- β -acevaltratrum, ein neues Valepotriate)," *Planta Medica*, vol. 50, p. 458, 1984.
- [16] G. K. Reolon, L. M. Braga, M. Camassola et al., "Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua-I* mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I," *Brain Research*, vol. 1076, no. 1, pp. 225–230, 2006.
- [17] R. G. Lister, "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse," *Psychopharmacology*, vol. 92, no. 2, pp. 180–185, 1987.
- [18] K. Scharadt, Z. Vissienon, U. Koetter, A. Brattström, and K. Nieber, "Modulation of postsynaptic potentials in rat cortical neurons by valerian extracts macerated with different alcohols: involvement of adenosine A 1- and GABAA-receptors," *Phytotherapy Research*, vol. 21, no. 10, pp. 932–937, 2007.
- [19] C.-S. Yuan, S. Mehendale, Y. Xiao, H. H. Aung, J.-T. Xie, and M. K. Ang-Lee, "The gammaminobutyric acidergic effects of valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity," *Anesthesia and Analgesia*, vol. 98, no. 2, pp. 353–358, 2004.
- [20] C. Nencini, F. Cavallo, A. Capasso et al., "Binding studies for serotonergic, dopaminergic and noradrenergic receptors of *Valeriana adscendens* Trel. extracts," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 108, no. 2, pp. 185–187, 2006.
- [21] B. Schumacher, S. Scholle, J. Hölzl, N. Khudeir, S. Hess, and C. E. Müller, "Lignans isolated from Valerian: identification and characterization of a new olivil derivative with partial

- agonistic activity at A1 adenosine receptors," *Journal of Natural Products*, vol. 65, no. 10, pp. 1479–1485, 2002.
- [22] S. Gutierrez, M. K. Ang-Lee, D. J. Walker, and J. P. Zacny, "Assessing subjective and psychomotor effects of the herbal medication valerian in healthy volunteers," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 78, no. 1, pp. 57–64, 2004.
- [23] M. Rabbani, S. E. Sajjadi, and A. Mohammadi, "Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 181–186, 2008.
- [24] Y. Djeridane, B. Lemmer, and Y. Touitou, "Diazepam affects both level and amplitude of rat locomotor activity rhythm but has no effect on core body temperature," *Chronobiology International*, vol. 22, no. 6, pp. 975–985, 2005.
- [25] J. L. McGaugh, "Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage," *Brain Research Bulletin*, vol. 23, no. 4-5, pp. 339–345, 1989.
- [26] M. G. Packard and L. A. Teather, "Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphopentanoic acid," *Behavioral Neuroscience*, vol. 111, no. 3, pp. 543–551, 1997.
- [27] R. Roesler, M. I. Kopschina, R. M. Rosa, J. A. P. Henriques, D. O. Souza, and G. Schwartzmann, "RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 486, no. 1, pp. 35–41, 2004.

2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO CAPÍTULO 2

ABOURASHED, E. A.; KOETTER, U.; BRATTSTROM, A. *In vitro* binding experiments with a Valerian, hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors. *Phytomedicine* [S.I.], v. 11, n. 7-8, p. 633-8, Nov 2004.

AL-MAJED, A. A.; AL-YAHYA, A. A.; AL-BEKAIRI, A. M.; AL-SHABANAH, O. A.; QURESHI, S. Studies on the cytological and biochemical effects of valerian in somatic and germ cells of Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol* [S.I.], v. 44, n. 11, p. 1830-7, Nov 2006.

ANDREWS, M. J.; BASU, A. US Patent. *Process for the extraction of valerian root*. Patente No. 6 913 770 B2, Jul 2005.

BACKLUND, A.; MORITZ, T. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochem Syst Ecol* [S.I.], v. 26, n. 3, p. 309-35, Abr 1998.

BANERJEE, S.; RAHMAN, L.; UNİYAL, G. C.; AHUJA, P. S. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogeneses* induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* dc. *Plant sci* [S.I.], v. 131, n. 2, p. 203-8, Fev 1998.

BARNES, P. M.; POWELL-GRINER, E.; MCFANN, K.; NAHIN, R. L. Complementary and alternative medicine use among adults: United States. *Adv Data* [S.I.], v. 343, p. 1-19, Maio 2004.

BASELGA, J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* [S.I.], v. 312, n. 5777, p. 1175-8, Maio 2006.

BECKER, H.; SCHRALL, R. Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact plants. *J Nat Prod* [S.I.], v. 43, n. 6, p. 721-3, Nov 1980.

BELL, C. D.; DONOGHUE, M. J. Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Org Divers Evol* [S.I.], v. 5, n. 2, p. 147-59, Jun 2005.

BLUMENTHAL, M. Valerian root. In: BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. (Eds.). *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Newton, MA: *Integrative Medicine Communications*, p. 394-400, 2000.

BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; HENDRIKS, H.; ZWAVING, J. H.; DE SMET, P. A. G. M.; TITTEI, G.; WIKSTRÖM, H. V.; SCHEFFER, J. J. C. Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations. *Phytochem Anal* [S.I.], n. 7, n. 3, p. 143-51, Maio-Jun 1996.

BOS, R.; HENDRIKS, H.; SCHEFFER, J. J. C.; WOERDENBAG, H. J. Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine* [S.I.], n. 5, p. 219-25, 1998.

BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; PRAS, N. Determination of valepotriates. *J Chromatogr A*, [S.l.], v. 967, n. 1, p. 131-46, Ago 2002.

BOUNTHANH, C.; BERGMANN, C.; BECK, J. P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med* [S.l.], v. 41, n. 1, p. 21-8, Jan 1981.

BOUNTHANH, C.; RICHERT, L.; BECK, J. P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. The action of valepotriates on the synthesis of DNA and proteins of cultured hepatoma cells. *Planta Med*, Abstract [S.l.], v. 49, n. 3, p. 138-42, 1983.

BRASIL. ANVISA, 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Pesquisa de Principio ativo*. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Seleciona_Principio.asp?AREA=1>. Acesso em: 15 jul. 2010.

BRASIL. ANVISA, 2010. Agência nacional de vigilância sanitária. *Consulta de produtos – Medicamentos*. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/medicamentos/frmconsultamedicamentos.asp>. Acesso em: 10 ago. 2010.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira (4.Ed.). *Valeriana*. São Paulo: Atheneu, 1988.

British Herbal Pharmacopoeia, 1988. British Pharmacopoeia Commission: London. Her Majesty's Stationery Office, 1988.

BRUNETON, J. *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants*. Paris: Lavoisier Publishing, 1995.

CARVALHO, C. M. B. *Otimização da micropropagação e estabelecimento de culturas de raízes de Valeriana glechomifolia Meyer*. Porto Alegre: UFRGS, 2003. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

CARVALHO, C. M. B.; MAURMANN, N.; LUZ, D. I.; FETT NETO, A. G.; RECH, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep* [S.l.], v. 23, n. 4, p. 251-5, 2004.

CASTILLO, P.; MÁRQUEZ, J.; RUBLUO, A.; HERNÁNDEZ, G.; LARA, M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci* [S.l.], v. 151, n. 2, p. 115-9, Fev 2000.

CASTILLO, P.; ZAMILPA, A.; MÁRQUEZ, J.; HERNÁNDEZ, G.; LARA, M.; ALVAREZ, L. Comparative study of differentiation levels and valepotriate content of *in vitro* cultures and regenerated and wild plants of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *J Nat Prod* [S.l.], v. 65, n. 4, p. 573-5, Abr 2002.

CAVADAS, C.; ARAUJO, I.; COTRIM, M. D.; AMARAL, T.; CUNHA, A. P.; MACEDO, T.; RIBEIRO, C. F. *In vitro* study on the interaction of *Valeriana officinalis* L. extracts and their amino acids on GABAA receptor in rat brain. *Arzneimittelforschung* [S.I.], v. 45, n. 7, p. 753-5, Jul 1995.

CAVALIERE, C.; REA, P.; LYNCH, M. E.; BLUMENTHAL, M. 2009. Herbal supplement sales experience slight increase in 2008. *HerbalGram*, v. 82, p. 58-61. Disponível em: <<http://cms.herbalgram.org/herbalgram/issue82/article3400.html?Issue=82>>. Acesso em: 02 Nov 2009.

COHEN, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* [S.I.], v. 268, n. 19, p. 5001-10, Out 2001.

DEF. *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*. (34.Ed.). Editora de Publicações Biomédicas, 2005/06.

DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. New York: John-Wiley & Sons, p. 466, 2000.

DIETZ, B. M.; MAHADY, G. B.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N. R. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor *in vitro*. *Mol Brain Res* [S.I.], v. 138, n. 2, p. 191-7, Ago 2005.

DUAN, Z.; GUO, S.; HE, D.; LIU, X. Patente Chinesa: Beijing Peking University Wbl Biotech Co., Ltd. 2009 pat. *Method for preparing valeriana extract and its application as sedatives (Chinese)*. Chinese Patent No. 101396381 A, Abr, 2009. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu, 19 p. Abstract from TOXCENTER 2009:180351, 2009.

ENCISO-RODRÍGUEZ, R. Micropropagation of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *Planta Med* [S.I.], v. 63, n. 3, p. 274-5, Jun 1997.

European pharmacopoeia, 1995. Strasbourg: Council of Europe Publishing.

ESPINOSA, S.; DIAZ, S.; BRIGNOLE E. A. Optimal design of supercritical fluid processes. *Comput Chem Eng* [S.I.], v. 24, n. 2-7, p. 1301-7, Jul 2000.

FACHINETTO, R.; VILLARINHO, J. G.; WAGNER, C.; PEREIRA, R. P.; AVILA, D. S.; BURGER, M. E.; CALIXTO, J. B.; ROCHA, J. B.; FERREIRA, J. Valeriana officinalis does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [S.I.], v. 31, n. 7, p. 1478-86, Out 2007.

FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A. C.; MARDER, M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Beh* [S.I.], v. 77, n. 2 p. 399-404, Fev 2004.

FLORIO, C.; FRAUSIN, F.; VERTUA, R.; GAION, R. M. Involvement of P1 receptors in the effect of forskolin on cyclic AMP accumulation and export in PC12 cells. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 57, n. 4, p. 355-64, Feb 1999.

FUZZATI, N.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; MSONTHI, J. D.; MAVI, S.; MOLLEYRES, L. P. Isolation and antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. *Phytochem Anal* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 76-85, Mar 1996.

GAO, X. Q.; BJÖRK, L. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia* [S.I.], v. 71, n. 1, p. 19-24, Feb 2000.

GARRARD, J.; HARMS, S.; EBERLY, L. E.; MATIAK, A. Variations in product choices of frequently purchased herbs: caveat emptor. *Arch Intern Med* [S.I.], v. 163, n. 19, p. 2290-5, Out 2003.

GIAMAS, G.; STEBBING, J.; VORGIAS, C. E.; KNIPPSCHILD, U. Protein kinases as targets for cancer treatment. *Pharmacogenomics* [S.I.], v. 8, n. 8, p. 1005-16, Ago 2007.

GIAMAS, G.; MAN, Y. L.; HIRNER, H.; BISCHOF, J.; KRAMER, K.; KHAN, K.; AHMED, S. S.; STEBBING, J.; KNIPPSCHILD, U. Kinases as targets in the treatment of solid tumors. *Cell Signal* [S.I.], v. 22, n. 7, p. 984-1002, Jul 2010.

GILANI, A. H.; KHAN, A.; JABEEN, Q.; SUBHAN, F.; GHAFAR, R. Antispasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K⁺ channel activation. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 100, n. 3, p. 347-52, Set 2005.

GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P.; KAPETANIDIS, I. High-yield production of valepotriates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. *Plant Cell Rep*, v. 11, n. 7, p. 339-42, Jul 1992

GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P.; KAMALAPRIJA, P.; BURGER, U. An iridoid diester from *Valeriana officinalis* var. *Sambucifolia* hairy roots. *Phytochemistry*, v. 38, n. 1, p. 103-5, Jan 1995.

HALLAM, K. T.; OLVER, J. S.; MCGRATH, C.; NORMAN, T. R. Comparative cognitive and psychomotor effects of single doses of *Valeriana officinalis* and triazolam in healthy volunteers. *Hum Psychopharmacol*, v. 18, n. 8, p. 619-25, Dez 2003.

HATTESOHL, M.; FEISTEL, B.; SIEVERS, H.; LEHNFELD, R.; HEGGER, M.; WINTERHOFF, H. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine*, v. 15, n. 1-2, p. 2-15, Jan 2008.

HAZELHOFF, B.; MALINGRE, T. M.; MEIJER, D. K. Antispasmodic effects of valeriana compounds: an in-vivo and in-vitro study on the guinea-pig ileum. *Arch Int Pharmacodyn Ther* [S.I.], v. 257, n. 2, p. 274-87, Jun 1982.

HEI, Y. J.; MACDONELL, K. L.; MCNEILL, J. H.; DIAMOND, J. Lack of Correlation between activation of cyclic AMP-dependent protein kinase and inhibition of contraction of rat vas deferens by cyclic AMP analogs. *Mol Pharmacol* [S.I.], v. 39, n. 2, p. 233-8, Feb 1990.

HELMBRECHT, K.; RENSING, L. Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurochem Res* [S.I.], v. 24, n. 10, p. 1293-9, Oct 1999.

HERRERA-ARELLANO, A.; LUNA-VILLEGAS, G.; CUEVAS-URIOSTEGUI, M. L.; ALVAREZ, L.; VARGAS-PINEDA, G.; ZAMILPA-ALVAREZ, A.; TORTORIELLO, J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of Valeriana edulis standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Med* [S.I.], v. 67, n. 8, p. 695-9, Nov 2001.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chem* [S.I.], v. 98, n. 1, p. 136-48, Jul 2006.

HOBBS, C. Valerian. *Herbalgram* [S.I.], v. 21, p. 19-34, 1989.

HOLBROOK, A.; CROWTHER, R.; LOTTER, A.; CHENG, C.; KING, D. Meta-analysis of benzodiazepine use in the treatment of insomnia. *CMAJ* [S.I.], v. 162, n. 2, p. 225-33, Jan 2000.

HOUGHTON, P. J. Valerian. *The Genus Valeriana*. London: Harwood, 1997.

HOUGHTON, P. J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J Pharm Pharmacol* [S.I.], v. 51, n. 5, p. 505-12, Maio 1999.

HUANG, B.; QIN, L.; CHU, Q.; ZHANG, Q.; GAO, L.; ZHENG, H. Comparison of headspace SPME with hydrodistillation and SFE for analysis of the volatile components of the roots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*. *Chromatographia* [S.I.], v. 69, n. 5-6, p. 489-96, Mar 2009.

HUI-LIAN, W.; FANG, Z. D.; FENG, L. Z.; YANG, L.; RONG, L. Q.; ZHEN, W. Y. *In vitro* study on the genotoxicity of dichloromethane extracts of valerian (DEV) in human endothelial ECV304 cells and the effect of vitamins E and C in attenuating the DEV-induced DNA damages. *Toxicol Appl Pharm* [S.I.], v. 188, n. 1, p. 36-41, Abr 2003.

KAUR, R.; SOOD, M.; CHANDER, S.; MAHAJAN, R.; KUMAR, V.; SHAMA, D. R. *In vitro* propagation of *Valeriana jatamansi*. *Plant Cell Tiss Org* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 227-9, 1999.

KITTIPONGPATANA, N.; DAVIS, D. L.; PORTER, J. R. Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Tiss Org* [S.I.], v. 71, n. 1, p 65-75, 2002.

KONDRASHIN, A.; NESTEROVA, M.; CHO-CHUNG, Y. S. Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on the external surface of LS-174T human colon carcinoma cells. *Biochemistry* [S.l.], v. 38, n 1, p. 172-9, Jan 1999.

MALVA, J. O.; SANTOS, S.; MACEDO, T. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extracts. *Neurotox Res* [S.l.], v. 6, n. 2, p. 131-40, 2004.

MARCHIORO, M. K. *Avaliação in vitro da atividade antiproliferativa de extratos de Valeriana glechomifolia*. Porto Alegre: UFRGS, 2009. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

MATHUR, J.; AHUJA, P. S. Plant regeneration from callus of *Valeriana wallichii*. *Plant Cell Rep* [S.l.], v. 9, n. 9, p. 523-5, 1991.

MATHUR, J. Plantelet regeneration from suspension cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Sci* [S.l.], v. 81, n. 1, p. 111-5, 1992.

MAURMANN, N.; LUZ, D.; CARVALHO, C.M.B.; RECH, S.B. Caracterização do crescimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia*. *Braz J Plant Physiol*, v. 15, 2003.

MAURMANN, N. *Valeriana glechomifolia: crescimento e produção de valepotriatos em diferentes meios nutritivos e avaliação preliminar de atividade neurofarmacológica*. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

MAURMANN, N.; CARVALHO, C. M. B.; SILVA, A. L.; FETT NETO, A. G.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* [S.l.], v. 42, p. 50-53, Jan-Fev 2006.

MAURMANN, N.; VIDAL, L. F.; STRECK, E.; BIANCINI, G. B.; MARCHIORO, M. K., RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Role of nutrient medium composition on growth characteristics and valepotriate production in *Valeriana glechomifolia* extended period stock cultures. In: Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* [S.l.], n. 44, n. 3, p. 209-215, Abr 2008.

MAXWELL, C. R.; KANES, S. J.; ABEL, T.; SIEGEL, S. J. Phosphodiesterase inhibitors: a novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications. *Neuroscience* [S.l.], v. 129, n. 1, p. 101-7, 2004.

MENNINI, T.; BERNASCONI, P.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *In vitro* study on the interaction of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots

with GABA, benzodiazepine and barbiturate receptors in rat brain. *Fitoterapia* [S.I.], v. 64, p. 291-300, 1993.

METZGER, H.; LINDNER, E. Forskolin a novel adenylate cyclase activator. *IRCS Medical Science Library Compendium* [S.I.], v. 9, p. 99 1981 apoud PFEUFFER, T.; METZGER, H. 7-O-hemisuccinyl-deacetyl forskolin – sepharose: a novel affinity support for purification of adenylate cyclase. *FEBS Letters*, [S.I.], v. 146, n. 2, p. 369-75, 1982.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; FERNÁNDEZ, S.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Beh* [S.I.], v. 75, p. 537-45, 2003.

MEOLIE, A. L.; ROSEN, C.; KRISTO, D.; KOHRMAN, M.; GOONERATNE, N.; AGUILLARD, R.N.; FAYLE, R.; TROELL, R.; TOWNSEND, D.; CLAMAN, D.; HOBAN, T.; MAHOWALD, M. Oral nonprescription treatment for insomnia: an evaluation of products with limited evidence. *J Clin Sleep Med*. [S.I.], v. 1, n. 2, p. 173-87, Abr 2005.

MILKOVA, E.; ATANASOV, A.; PANAIOTOV, K. H. Some aspects of the initiation of callus and suspension cultures of *Valeriana officinallis* var. *Diliana*. *Acta Biotechnol* [S.I.], v. 8, n. 5, p. 427-33, 1988.

MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia* [S.I.], v. 66, p. 99-112, 1995.

MORIN, C. M.; CULBERT, J. P.; SCHWARTZ, S. M. Nonpharmacological interventions for insomnia: a meta-analysis of treatment efficacy. *Am J Psychiatry* [S.I.], v. 151, p. 1172-80, 1994.

MORRIS, C. A.; AVORN, J. Internet marketing of herbal products. *JAMA* [S.I.], v. 290, n. 11, p. 1505-9, Set 2003.

MÜLLER, C.; SCHUMACHER, B.; BRATTSTRÖM, A.; ABOURASHED, E. A.; KOETTER, U. Interaction of valerian extracts and a fixed valerian-hop extract combination with adenosine receptors. *Life Sci* [S.I.], v. 71, n. 16, 1939-49, Set 2002.

NCCAM, 2009. National Center for Complementary and Alternative Medicine. *Herbal at a glance*. A quick guide to herbal supplements. Valerian (p. 88). U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health. Disponível em: <http://nccam.nih.gov/health/NIH_Herbs_at_a_Glance.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2010.

NISHIYA, K.; KIMURA, T.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Sesquiterpenoids and iridoid glycosides from *Valeriana fauriei*. *Phytochemistry* [S.I.], v. 31, n. 10, p. 3511-4, Out 1992.

OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; DE ANDRADE, D. E. V.; SARACENO, E.; AONBERTOLINO, L.; CAPANI, F.; EL BACHA, R. S.; GIRALDEZ, L. D. Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an *in vitro* experimental model of Parkinson disease. *Neurochem Res* [S.I.], v. 34, n. 2, p. 215-20, Maio 2009.

ORTIZ, J. G.; RASSI, N.; MALDONADO, P. M.; GONZÁLEZ-CABRERA, S.; RAMOS, I. Commercial valerian interactions with [3H]Flunitrazepam and [3H]MK-801 binding to rat synaptic membranes. *Phytot Res* [S.I.], v. 20, n. 9, p. 1373-8, Set 2006.

PATOČKA, J.; JAKL, J. Biomedically relevant chemical constituents of *Valeriana Officinalis*. *Appl Biomed* [S.I.], v. 8, p. 11-8, 2010

PERRY, C.; SKLAN, E. H.; SOREQ, H. CREB Regulates AChE-R-induced proliferation of glioblastoma cells. *Neoplasia* [S.I.], v. 6, n. 3, p. 279-86, Maio/Jun 2004.

PETKOV, V. Plants and hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action. *Am J Chin Med* [S.I.], v. 7, n. 3, p. 197-236, Out 1979.

Portaria IBAMA. *Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção*. IBAMA n.º 37-N, de 03 de abril de 1992.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. (Eds.). *Neuroscience* (3.Ed.). Hardcover: Sinauer Associates. Mechanisms of production and degradation of cAMP (Fig. 7.7c, p. 173). Jun. 2004.

RAO, Y. J.; XI, L. Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts. *Acta Pharmacol Sin* [S.I.], v. 30, n. 1, p. 1-24, Jan 2009.

ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994-2003). *J Supercrit Fluids* [S.I.], v. 34, n. 2, p. 109-117, Jun 2005.

ROUT, G. R.; SAMANTARY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 91-120, Abr 2000.

RUSSOWSKI, D. *Produção de valepotriatos em culturas líquidas de plantas de Valeriana glechomifolia Meyer (Valerianaceae)*. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Tese (Programa de Pós-Graduação em em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006a.

RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell, Tiss Organ Cult* [S.I.], v. 86, n. 2, p. 211-8, Jul 2006b.

SAFARALIE, A.; FATEMI, S.; SEFIDKON, F. Essential oil composition of *Valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran. Comparative analysis between supercritical CO2 extraction and hydrodistillation. *J Chromatogr A* [S.I.], v. 1180, n. 1-2, p. 159-64, Fev 2008.

SALLES, L. A.; A, L. S.; RECH, S. B.; ZANATTA, N.; VON POSER, G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem Syst Ecol* [S.I.], v. 28, n. 9, p. 907-10, Nov 2000.

SALLES, L. A.; SILVA, A. L.; FETT NETO, A. G.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates. *Plant Sci* [S.I.], v. 163, n. 1, p. 165-8, Jul 2002.

SALLES, L.; NUNES, J. M.; CARGNIN, S.; BALADÃO, L. F.; RATES, S. M. K.; CASSEL, E.; VARGAS, R. F.; RECH, S. B.; VON POSER, G. Enrichment of valepotriates from *Valeriana glechomifolia* Meyer by supercritical fluid extraction. Submetido para *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2010.

SAMPAIO, M. I. R.; CASTILHO, R. O.; KAPLAN, M. A. C. Valerianaceae: etnofarmacologia, farmacologia e química. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 3, n. 74, p. 54-6, 1993.

SCHUMACHER, B.; SCHOLLE, S.; HOLZL, J.; KHUDEIR, N.; HESS, S.; MULLER, C. E. Lignans isolated from valerian: identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A(1) adenosine receptors. *J Nat Prod* [S.I.], v. 65, n. 10, p. 1479-85, Out 2002.

SEAMON, K. B.; DALY, J. W. Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* [S.I.], v. 20, p. 1-150, 1986 *apud* FLORIO, C.; FRAUSIN, F.; VERTUA, R.; GAION, R. M. Involvement of P1 Receptors in the Effect of Forskolin on Cyclic AMP Accumulation and Export in PC12 Cells. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 57, n. 4, 355-64, Fev 1999.

SILVA, A. L.; RECH, S. B.; VON POSER, G. L. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to South Brazil. *Planta Med* [S.I.], v. 68, n. 6, p. 570-2, Jun 2002.

SINGH, R. D.; GOPICHAND; MEENA, R. L.; SHARMA, B.; SINGH, B.; KAUL, V. K.; AHUJA, P. S. Seasonal variation of bioactive components in *Valeriana jatamansi* from Himachal Pradesh, India. *Ind Crops Products*, v. n. 3, p. 292-6, Nov 2010.

SOBRAL, M. Flora ilustrada do Rio Grande do Sul/25: Valerianaceae. *Boletim do Instituto de Biociências* [S.I.], v. 58, p. 1-61, 1999a.

SOBRAL, M. *Valeriana tajuvensis* (Valerianaceae). A new species from southern Brazil. *Novon* [S.I.], v. 9, p. 114-7, 1999b.

SOBRAL, M. *Valeriana eupatoria* (Valerianaceae). A new species from Rio Grande do Sul. *Novon* [S.I.], v. 10, p. 149-52, 1999c.

SUDATI, J. H.; FACHINETTO, R.; PEREIRA, R. P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SOARES, F. A.; DE VARGAS BARBOSA, N. B.; ROCHA, J. B. *In vitro* antioxidant activity of *Valeriana officinalis* against different neurotoxic agents. *Neurochem Res* [S.I.], v. 34, n. 8, p. 1372-9, Ago 2009.

TABACH, R.; RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product - CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L., and *Valeriana officinalis* L.). *Phytother Res* [S.I.], v. 23, n. 1, p. 33-40, Jan 2009.

TANG, Y.; LIU, X.; YU, B. Iridoids from the rhizomes and roots of *Valeriana jamantasi*. *J Nat Prod* [S.I.], v. 65, p. 1949-52, 2002.

TESCH, B. J. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. *Am J Obstet Gynecol* [S.I.], v. 188(5 Suppl):S44-55. Maio 2003.

THIES, P. W.; FUNKE, S. [On the active ingredients in baldrian. 1. Detection and isolation of isovalerian acid esters with sedative effect from roots and rhizomes of various valerian and kentranthus species]. *Tetrahedron Lett* [S.I.], v. 11, p. 1155-62, Mar 1966.

THIES, P. W. Linarin-isovalerianate, a currently unknown flavonoid from *Valeriana wallichii* D.C. 6. Report on the active substances of valeriana. *Planta Med* [S.I.], v. 16, n. 4, 363-71, Dez 1968.

THIES, P. W. [On the chromogenic behavior of valepotriate. 5. Report on the active substances of Valerian]. *Arzneimittelforschung* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 319-22, Mar 1969.

TORI, M.; YOSHIDA, M.; YOKOYAMA, M.; ASAKAWA, Y. A guaiane-type sesquiterpene, valeracetate from *Valeriana officinalis*. *Phytochemistry* [S.I.], v. 41, n. 3, p. 977-9, Fev 1996.

TOUSIA, S. E.; RADJABIAN, T.; EBRAHIMZADEH, H.; NIKNAM, V. Enhanced production of valerenic acids and valepotriates by in vitro cultures of *Valeriana officinalis* L. *Internat J Plant Prod* [S.I.], v. 4, n. 3, Jul 2010.

VEITH, J.; SCHNEIDER, G.; LEMMER, B.; WILLEMS, M. The effect of degradation products of valepotriates on the motor activity of light-dark synchronized mice. *Planta Med* [S.I.], v. 3, p. 179-83, Jun 1986.

VIOLON, C. J.; DEKEGEL, D.; VERCRUYSSSE, A. Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues of Valerianeae. *J Nat Prod* [S.I.], v. 47, n. 6, p. 934-40, Nov 1984.

WAGNER, H.; JURCIC, K.; SCHATTE, R. Vergleichende Untersuchungen über die sedierende Wirkung Baldrianextrakten von und ihren Abbauprodukten. *Planta Med* [S.I.], v. 38, n. 8, p. 358-65, 1980.

WALTER, U.; UNO, I.; LIU, A. Y. C.; GREENGARD, P. Identification, characterization, and quantitative measurement of cyclic AMP receptor proteins in cytosol of various tissues using a photoaffinity ligand. *J Biol Chem* [S.I.], v. 252, n. 18, p. 6494-500, Set 1977.

WASOWSKI, C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA(A)

receptors, from *Valeriana wallichii*. *Planta Med* [S.I.], v. 68, n. 10, p. 934-6, Out 2002.

WHO, 1999. World Health Organization. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*. v. 1. Malta: WHO Graphics, 1999.

WILLS, R. B. H.; SHOHET, D. (7 2009). Changes in valerenic acids content of valerian root (*Valeriana officinalis* L. s.l.) during long-term storage. *Food Chem* [S.I.], v. 115, n. 1, p. 250-3, Jul 2009.

ZIZOVIC, I.; STAMENIC, M.; IVANOVIC, J.; ORLOVIC, A.; RISTIC, M.; DJORDJEVIC, S.; PETROVIC, S. D.; SKALA, D. Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root. *J Supercrit Fluids* [S.I.], v. 43, n. 2, p. 249-58, Dez 2007.

YAMASHITA, N.; YAMAUCHI, M.; BABA, J.; SAWA, A. Phosphodiesterase type 4 that regulates cAMP level in cortical neurons shows high sensitivity to rolipram. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 337, n. 1, p. 95-102, Out 1997.

3 DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais como forma de tratamento de patologias cresce mundialmente e, com o aumento do uso da fitoterapia, surge a necessidade de se estudar os componentes químicos e suas atividades biológicas. Na presente tese, foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo* para avaliação da atividade biológica de moléculas de duas plantas medicinais, *Mangifera indica* e *Valeriana glechomifolia*.

Encontram-se relatadas na literatura diversas atividades biológicas para mangiferina e para o extrato da casca da árvore de *Mangifera indica*, entre elas anti-inflamatórias, antialérgicas e neuroprotetoras (GOTTLIEB *et al.*, 2006; IBARRETXE *et al.*, 2006), imunomoduladoras (LEIRO *et al.*, 2004), antioxidantes (SATO *et al.*, 1992; PARDO-ANDREU *et al.*, 2005a; 2005b; 2006a; 2006b; 2008a; 2008b), citotóxicas e antineoplásicas (GUHA *et al.*, 1996; YOSHIMI *et al.*, 2001), antivirais (ZHENG e LU, 1990; GUHA *et al.*, 1996) e antidiabéticas (ICHIKI *et al.*, 1998).

Mangiferina é o componente majoritário do extrato da casca da árvore de *Mangifera indica* (aproximadamente 7g/100g de peso seco do ECAM) (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002). Devido às propriedades biológicas relacionadas a aspectos cognitivos de mangiferina e do ECAM, estudamos o efeito dessas moléculas em aspectos da memória.

Para avaliação da consolidação nos testes de memória, utiliza-se a administração das moléculas imediatamente após o treino, para evitar confusão de efeitos na aquisição, desempenho ou evocação (MCGAUGH, 1966). A tarefa de reconhecimento de objeto (RO) é um teste de aprendizado simples, uma memória dos animais correspondente à memória declarativa de fatos e episódios em humanos que avalia a memória não espacial, baseada na capacidade de roedores

de reconhecerem um objeto familiar e na tendência natural de explorarem um novo objeto (IZQUIERDO, 2002).

O tratamento agudo sistêmico de ratos com as três doses de mangiferina utilizadas (10, 50, ou 100mg/kg), imediatamente após o treino, produziu o efeito facilitatório da memória na tarefa de RO no teste realizado 24h após o treino, em comparação aos animais tratados com o veículo (controle). A análise do comportamento dos animais no campo aberto após o tratamento com mangiferina demonstrou que as três doses utilizadas não afetaram a atividade de locomoção (número de cruzamentos), o comportamento exploratório do ambiente (número de "rearings"), e a ansiedade (latência e número de bolos fecais), bem como a motivação durante os treinos (tempos de exploração dos objetos). Estes resultados indicam que a melhora na consolidação da memória de longa duração na tarefa de RO induzida pela mangiferina não pode ser atribuída a alterações na função sensorio-motora. Além disso, como o tempo de meia-vida da mangiferina varia de 3 às 7h e como os testes comportamentais foram realizados 24h após a sua administração, é improvável que os efeitos sensorio-motores não específicos de mangiferina estejam envolvidos no resultado do teste de memória de RO. Como a administração de mangiferina foi após o treino, o efeito da mangiferina foi na etapa de consolidação da memória de RO, sem influência na aquisição da memória. A ausência da retenção da memória com administração de 100mg/kg de mangiferina 6h após o treino (administração tardia), também indica efeito específico na consolidação da memória de RO.

Os fatores neurotróficos, como o fator de crescimento neural (NGF), promovem a diferenciação, a sobrevivência, e a manutenção funcional das células nervosas; crescentes evidências sugerem que, entre outras funções, a sinalização por NGF promove funções neuroprotetoras e de reparação (SOFRONIEW *et al.*, 2001). Existem estudos da correlação entre os níveis cerebrais de NGF e alterações cognitivas em diferentes modelos animais, como na tarefa de RO (CHANMAHASATHIEN *et al.*, 2003; DE ROSA *et al.*, 2005; NIEWIADOMSKA *et al.*, 2006; RISPOLI *et al.*, 2008; HENNIGAN *et al.*, 2009). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estimula a síntese e a secreção de NGF em camundongos quiescentes, em fibroblastos humanos e em células de glioblastoma humano (HATTORI *et al.*, 1996). Também foi demonstrado que TNF- α , conhecido por seus papéis nas respostas celulares à lesão tecidual, foi produzido em resposta a atividade fisiológica nos

circuitos neuronais (ALBENSI e MATTSON, 2000). O TNF estimula receptores em neurônios ligados à ativação do fator de transcrição NF-kappaB, e esta via de sinalização pode modular a excitabilidade neuronal e a vulnerabilidade dos neurônios à excitotoxicidade. Albensi e Mattson (2000) sugerem um papel importante do TNF e das vias de sinalização que modulam a atividade do NF-kappaB na regulação da plasticidade sináptica do hipocampo. Devido às atividades de NGF e TNF- α correlacionadas com efeitos na memória, avaliamos a ação da mangiferina sobre a secreção de NGF e de TNF- α por células de glioblastoma humano, como modelo experimental *in vitro* do mecanismo molecular mediador do efeito de mangiferina de melhora da memória na tarefa de RO. Mangiferina promoveu o aumento da secreção do fator neurotrófico NGF e da citocina TNF- α nas células estudadas. Apesar de não ser conhecido o mecanismo pelo qual a incubação com mangiferina aumentou a concentração de TNF- α , o aumento dos níveis desta citocina pode explicar os níveis mais elevados de NGF no sobrenadante de células incubadas com mangiferina, bem como auxiliar a regulação da plasticidade sináptica. É improvável que o aumento do número de células induzido por mangiferina seja responsável pelo aumento da secreção de NGF, já que a proliferação celular observada com o tratamento de 5 μ g/ml foi maior que a proliferação observada com o tratamento de 50 μ g/ml de mangiferina (160 e 154%, respectivamente), mas o aumento dos níveis secretados de NGF foram de 7% para 5 μ g/ml de mangiferina e 11% para 50 μ g/ml de mangiferina. Esses resultados sugerem um papel neuromodulador do fator neurotrófico NGF e da citocina TNF- α na plasticidade sináptica cerebral e possivelmente, no aprendizado e na memória. O uso clínico dos fatores neurotróficos clássicos tem sido limitado por razões técnicas, como dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica. Portanto, a identificação de pequenas moléculas, como a mangiferina, que mimetizam propriedades dos fatores neurotróficos, são alvos potenciais para o tratamento de doenças do SNC.

Evidências indicam que as áreas cerebrais envolvidas na mediação ou na modulação da tarefa comportamental de reconhecimento de objeto podem incluir o hipocampo dorsal (CLARK *et al.*, 2000; BROADBENT *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2006), os córtices perirrinal e insular (BERMUDEZ-RATTONI *et al.*, 2005) e a amígdala basolateral (ROOZENDAAL *et al.*, 2006). No Artigo 3, estudamos se os efeitos sistêmicos de mangiferina na memória de RO são mediados especificamente

pelas áreas cerebrais hipocampo ou amígdala. A microinfusão de mangiferina no hipocampo, imediatamente após o treino na tarefa de RO, resultou na melhora na consolidação dessa memória não espacial, quando testada 24h (LTM) após o treinamento de ratos, de maneira similar ao efeito observado na administração sistêmica. Os animais controle, que receberam a microinfusão do veículo (10% de DMSO) no hipocampo não apresentaram aprendizado, enquanto que os animais que receberam infusão de mangiferina apresentaram aprendizado. É possível que a concentração de 10% de DMSO infundida no hipocampo cause prejuízo da memória na tarefa de RO. Já a infusão intra-amigdalilar de mangiferina não demonstrou diferença no aprendizado em comparação com o grupo controle. Nossos resultados indicam a participação do hipocampo na melhora da consolidação da memória de reconhecimento de objeto novo, mediada por mangiferina.

Para avaliação do efeito de mangiferina na memória de RO em um modelo animal distinto, no Artigo 4 descrevemos a utilização de fêmeas de camundongos transgênicos com fenótipo de ataxia espinocerebelar do tipo 2 (SCA-2). O único grupo que apresentou aprendizado na memória de reconhecimento de objeto novo foram as fêmeas de camundongos SCA-2 tratadas cronicamente, durante doze meses, com mangiferina. Não apresentaram aprendizado no teste de RO os animais atáxicos do grupo controle e atáxicos tratados oralmente com o ECAM, nas três doses utilizadas, durante doze meses, indicando que o ECAM não reverteu os déficits cognitivos da ataxia, e não influenciou a memória de reconhecimento de objeto.

Nossos resultados indicam que mangiferina promoveu o aprendizado em fêmeas de camundongos com fenótipo de SCA-2 na tarefa de memória de reconhecimento de objeto e melhorou a consolidação da memória de reconhecimento de objeto em ratos saudáveis por meio de um mecanismo que pode envolver o aumento dos níveis da neurotrofina NGF e da citocina TNF- α , com a participação do hipocampo.

A tarefa da esquia inibitória avalia a memória aversiva emocional; em humanos, representa uma forma de memória constantemente utilizada e necessária para a sobrevivência, pois evita, por exemplo, que coloquemos os dedos em uma tomada elétrica, que atravessemos a rua sem olhar para os lados ou que andemos por lugares perigosos (QUEVEDO *et al.*, 2003).

No Artigo 2, foi pesquisado o efeito da administração sistêmica das mesmas doses de mangiferina que melhoraram a memória de RO (doses de 10, 50 ou 100mg/kg), imediatamente após o treino na esQUIVA inibitória (EI). Mangiferina produziu a diminuição da retenção da memória de longa duração por treinamento aversivo e a redução do comportamento de “freezing” (congelamento), de forma independente da dose, indicando prejuízo na consolidação da memória aversiva, constatado no teste de 24h. A administração tardia de mangiferina (6h após o treino de EI) não produziu a diminuição da retenção da memória nessa tarefa, indicando seletividade temporal na consolidação da memória no teste de EI. Os dados indicam que a administração sistêmica de mangiferina pode produzir déficits na memória emocionalmente motivada.

A administração aguda oral do ECAM (extrato Vimang®, com quantificação de aproximadamente 16% de mangiferina) em ratos 1h antes do treino ou imediatamente após o treino na esQUIVA inibitória, assim como mangiferina, produziu a diminuição da retenção da memória aversiva de longa duração (LTM), bem como da memória curta duração (STM) (PREISLER *et al.*, 2009).

Mais experimentos são necessários para esclarecer os mecanismos subjacentes ao efeito prejudicial de mangiferina na memória aversiva. Como o complexo amigdalóide e suas conexões regulam o comportamento emocional e o hipocampo e suas conexões consolidam a informação da memória de longa duração, estudamos se os efeitos sistêmicos de mangiferina na memória de EI são mediados pelas estruturas cerebrais amígdala e hipocampo. Há necessidade do hipocampo e suas conexões para a formação de memórias contextuais em animais (EICHENBAUM *et al.*, 1996; EICHENBAUM, 1999), incluindo a esQUIVA inibitória e suas variantes (LORENZINI *et al.*, 1996; IZQUIERDO e MEDINA, 1997; IZQUIERDO *et al.*, 1999). A amígdala modula a consolidação de memórias de experiências estimuladas emocionalmente (MCGAUGH, 2004). No entanto, o efeito de piora da memória aversiva no teste de esQUIVA inibitória, observado após a administração sistêmica de mangiferina não foi observado nas microinfusões no hipocampo ou amígdala. O efeito de piora na memória na tarefa de EI pode ser mediado por áreas cerebrais como o córtex entorrinal, o córtex insular, ou neocórtex, uma vez que a plasticidade fisiológica após o condicionamento ao medo pode estar presente em outras regiões do cérebro sugerindo que as memórias de medo são provavelmente codificadas e armazenadas em uma rede neural distribuída em várias regiões

cerebrais (MCINTOSH e GONZALEZ-LIMA, 1998; POREMBA e GABRIEL, 2001). Por exemplo, a integridade funcional do hipocampo, septo medial, amígdala basolateral, núcleo do trato solitário, e regiões corticais (cingulado, insular, pré-frontal anterior e posterior) são necessárias durante a fase inicial de consolidação da memória (imediatamente e até 1,5 horas após o treino), enquanto que a dos córtices entorrinal e parietal é necessária durante uma fase posterior (0,5 a 3 horas ou 1 a 3 horas, respectivamente). Já a integridade funcional das regiões cerebrais que liberam neuromoduladores no hipocampo, amígdala e córtex, tais como núcleo basal, substância negra e núcleo parabraquial são necessários alguns dias após o treino (BERMÚDEZ-RATTONI *et al.*, 1991; IZQUIERDO *et al.*, 1997; AMBROGI LORENZINI *et al.*, 1999; MELLO e SOUZA *et al.*, 2000).

Na avaliação do efeito das moléculas de *M. indica* na memória aversiva de camundongos transgênicos com o fenótipo de ataxia espinocerebelar do tipo 2, as fêmeas tratadas cronicamente com o ECAM, durante 12 meses, apresentaram aprendizado na tarefa de EI (comparação entre o treino e o teste), e as fêmeas de camundongos atáxicas não tratados e as tratadas com mangiferina não apresentaram aprendizado, demonstrando que mangiferina não afetou a memória motivada emocionalmente. Estes resultados estão relacionados com os resultados dos experimentos do Artigo 2, em que mangiferina prejudicou a memória do medo em ratos saudáveis. Já a administração oral crônica do ECAM melhorou a memória emocionalmente motivada das fêmeas com SCA-2. Embora mangiferina seja a molécula presente em maior concentração no ECAM, mangiferina apresenta um perfil de atividade biológica distinta do ECAM, provavelmente devido à presença de outros polifenóis e moléculas com atividades biológicas presentes no extrato (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2002). As quantidades e proporções dos compostos em extratos complexos, que apresentam diversas moléculas, são dificilmente fixas, o que possivelmente gere resultados distintos, com extratos diferentes; mangiferina, por exemplo, é encontrada na concentração entre 4 e 16% do ECAM, sendo que quando está presente em maiores concentrações pode apresentar algum resultado não observado quando está presente em baixas concentrações. Acreditamos que as diversas classes de moléculas presentes no ECAM, por meio de seus efeitos aditivos e/ou sinérgicos, são responsáveis pelo aprendizado observado no teste de memória da esquiwa inibitória, nas fêmeas SCA-2, efeito que mangiferina isoladamente não produziu.

Os experimentos de NOR e EI também foram realizados com camundongos machos com SCA-2, porém poucos animais sobreviveram, provavelmente devido a maior severidade da enfermidade nos machos, não sendo possível a realização de análise estatística adequada.

Evidências farmacológicas e genéticas indicam que a plasticidade sináptica e a consolidação da memória de longa duração em tarefas espaciais e contextuais em roedores envolvam mecanismos moleculares moduladores, incluindo as vias de sinalização: ativação da proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII), fosfolipase C (PLC), proteína quinase C (PKC), adenosina monofosfato cíclica (AMPC), proteína quinase A (PKA), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e envolvam receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores de neurotransmissores e vias de transdução de sinais intracelulares, bem como a síntese de proteínas (IZQUIERDO E MEDINA, 1997; ALBERINI, 1999; MCGAUGH, 2000; SILVA, 2003; TONEGAWA *et al.*, 2003; ROESLER e MCGAUGH, 2010). Os mecanismos moleculares relacionados à atividade biológica de mangiferina na memória de RO são desconhecidos. É possível que mangiferina e outros compostos biologicamente ativos do ECAM influenciem os mecanismos moleculares envolvidos na plasticidade sináptica. Mais experimentos são necessários para esclarecer os mecanismos subjacentes ao efeito do ECAM na melhora da memória aversiva e os efeitos da mangiferina na melhora na memória de reconhecimento.

Neste sentido, foi demonstrado que mangiferina inibiu a atividade da monoamino oxidase (MAO) (BHATTACHARYA *et al.*, 1972; TOMIC *et al.*, 2005). A enzima MAO age convertendo as catecolaminas em seus respectivos aldeídos; também oxida outras monoaminas como a dopamina e a serotonina e controla o conteúdo de noradrenalina (KNOLL, 1989; RINNE *et al.*, 1991). Por estas atividades, inibidores da MAO, como a seleginina, são comumente empregados no tratamento da Doença de Parkinson. Mangiferina poderia modular a concentração de catecolaminas, o que pode explicar, pelo menos em parte, seu efeito benéfico da memória de RO.

Na tarefa de esquiva passiva, mangiferina reverteu o déficit induzido por escopolamina por meio da inibição da enzima acetilcolinesterase (JUNG *et al.*, 2009). Os inibidores da acetilcolinesterase demonstraram eficiência no tratamento

clínico na doença de Alzheimer (TREVISAN *et al.*, 2003), como o inibidor seletivo donepezil (DOODY, 1999). A doença de Alzheimer está associada com déficits de neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina (BRYNE *et al.*, 1998). Para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer, sugere-se que a elevação no nível da acetilcolina poderia melhorar sinais da doença, como a deficiência de aprendizagem (BIERER *et al.*, 1995). Mangiferina pode estar atenuando o déficit na memória da esQUIVA inibitória nas fêmeas de camundongos SCA2 por meio da inibição da acetilcolinesterase.

Intervenções clínicas com o extrato Vimang® em pacientes com AIDS ou idosos não produziu evidências visíveis de deterioração neurológica, mesmo com 2 a 6 meses de tratamento diário (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

Finalmente, como disfunções de memória têm sido relatadas associadas à SCA (BÜRK *et al.*, 2003), à doença de Alzheimer (BUCKNER *et al.*, 2004), ao envelhecimento e a outras demências (FLICKER *et al.*, 1987; PURDY *et al.*, 2002; SCHIAVETTO *et al.*, 2002), os resultados de nossos experimentos de aumento da retenção de memórias de RO e EI, promovidos por mangiferina e pelo ECAM, juntamente com a falta de toxicidade comprovada e a segurança clínica de ECAM (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007), suportam a idéia de que esta xantona e o extrato podem ser eficazes no tratamento do declínio cognitivo associado ao envelhecimento e demência e constituem uma base racional para a utilização destas moléculas na prevenção ou tratamento de déficits de memória em SCA-2 e provavelmente outras neurodegenerativas doenças, incluindo o envelhecimento.

Em relação à segunda planta estudada nesta tese, *Valeriana glechomifolia*, também encontramos atividades biológicas interessantes. Resultados anteriores de grupos de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul demonstraram que o cultivo *in vitro* representa um sistema adequado para produção sustentada e renovável de biomassa cataliticamente ativa de *V. glechomifolia* para produção de valepotriatos (SALLES *et al.*, 2000; SALLES *et al.*, 2002; CARVALHO, 2003; MAURMANN *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2004; MAURMANN *et al.*, 2006; RUSSOWSKI *et al.*, 2006a; 2006b; MAURMANN *et al.*, 2008). Devido à facilidade de obtenção e ao interesse de pesquisa de atividades biológicas dos valepotriatos obtidos de *V. glechomifolia*, nativa do Rio Grande do Sul e cultivada no Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Farmácia, no Laboratório de Fisiologia Vegetal do

Departamento de Botânica, e aclimatadas na Faculdade de Agronomia da UFRGS, realizamos testes experimentais *in vitro* e *in vivo* com estas moléculas.

Bounthanh *et al.* (1981) demonstraram potente citotoxicidade de valepotriatos em células. Nesse estudo *in vitro*, diidrovaltrato induziu 100% de mortalidade de células de hepatoma de ratos em 24h na concentração de 66µg/ml (0,28µM). Valtrato exibiu maior citotoxicidade do que diidrovaltrato. Os autores também demonstraram atividade antitumoral, em que o diidrovaltrato promoveu uma perceptível maior porcentagem de remissão definitiva do tumor ascístico de KREBS II em fêmeas de camundongos (BOUNTHANH *et al.*, 1981).

Os valepotriatos valtrato, diidrovaltrato e acevaltrato, isolados de *V. glechomifolia* por cromatografia em coluna demonstraram inibição da viabilidade de três linhagens tumorais (MARCHIORO, 2009). No Artigo 5, demonstramos que valepotriatos, isolados de *Valeriana glechomifolia* por extração em fluído supercrítico, inibiram a viabilidade de células da linhagem de glioma humano U138-MG e estudamos o mecanismo deste efeito. A ativação da enzima adenilato ciclase resulta no aumento dos níveis intracelulares do AMPc e conseqüentemente a ativação da proteína quinase A (PKA) (MISSALE *et al.*, 1998). PKA, quando ativada, fosforila canais de Na⁺, levando a uma diminuição do fluxo de íon Na⁺ (LI *et al.*, 1992; CANTRELL *et al.*, 1999; SMITH e GOLDIN, 1997), e a fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina estimula a fosforilação da proteína ligante de elemento em resposta ao AMPc (CREB), regulando assim a expressão de diversas outras vias e diversos genes (SVENNINGSSON, 2004).

O efeito dos valepotriatos na inibição da viabilidade celular foi revertido pelas menores doses de valepotriatos e atenuado na maior dose pelo cotratamento com o análogo do AMPc, o 8-Br-AMPc, um ativador da via AMPc/PKA. Já os ativadores da via AMPc/PKA rolipram e forskolina não apresentaram o mesmo efeito do 8-Br-AMPc. É possível que rolipram e forskolina não tenham apresentado efeito devido à necessidade de maiores concentrações destes ativadores para reverter o efeito de inibição da viabilidade dos valepotriatos, porém em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a mesma concentração dos ativadores da via do AMPc/PKA utilizada nesta tese, combinada com GRP, aumentou a viabilidade de células de glioblastoma U138-MG (FARIAS *et al.*, 2008). O 8-Br-AMPc, por ser um análogo exógeno com maior resistência à degradação das fosfodiesterases reverteu ou atenuou, dependendo da dose, a diminuição da viabilidade celular causada pelos

valepotriatos. Já o rolipram e a forskolina, que também atuam estimulando o aumento do AMPc, não aumentaram a viabilidade das células diminuída pelos valepotriatos; como esses compostos agem aumentando o AMPc endógeno, que é degradado pelas fosfodiesterases, especulamos que em menores tempos de avaliação ou a utilização de doses mais elevadas possam estimular a viabilidade prevenindo os efeitos inibitórios do valepotriatos em células de glioma. Nenhum dos ativadores da via AMPc/PKA nas doses utilizadas nos experimentos possuiu atividade por si só.

Os experimentos permitiram analisar a existência de interações funcionais entre os valepotriatos e a sinalização por AMPc em linhagens de células de glioma e investigar o possível papel da valepotriatos como um alvo para o tratamento de gliomas malignos. Os resultados deste estudo indicam que somente um ativador da via do AMPc/PKA, o 8-Br-AMPc, pode induzir efeitos opostos aos valepotriatos na viabilidade das células do glioblastoma.

A estrutura dos valepotriatos foi elucidada na década de 1960; inicialmente, foram considerados responsáveis pelas ações biológicas, porém, considerando a instabilidade destes compostos e com a descoberta de outras moléculas de Valeriana, surgiram controvérsias em relação às atividades sedativas dos valepotriatos (BOS *et al.*, 2002; MARDER *et al.*, 2003). Embora os valepotriatos apresentem-se estáveis em metanol anidro, estocado a 20°C, são altamente instáveis sob influência da luz, calor e umidade e em soluções aquosas, hidroalcoólicas, ácidas ou básicas, formando os produtos de degradação baldrinais, os quais são bastante reativos gerando polímeros (BOS *et al.*, 2002). O homobaldrinal (um produto de degradação de valepotriatos) demonstrou atividade farmacológica quando administrado oralmente, podendo agir como um pró-fármaco (MORAZZONI e BOMBARDELLI, 1995; HOUGHTON, 1999).

Em alguns estudos clínicos, os fitoterápicos a base de Valeriana não foram efetivos no tratamento da insônia. Muitos estudos não definem quantitativamente e qualitativamente os componentes do extrato de valerianas, ou não realizam a quantificação dos valepotriatos juntamente com o estudo da atividade biológica, o que é importante devido à instabilidade destes compostos. Algumas preparações convencionais de valeriana contêm pouco ou nenhum conteúdo valepotriatos (TYLER, 1994; European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 1996-1997). Embora alguns estudos foquem os valepotriatos, as proporções entre

os valepotriatos majoritários são diferentes entre *V. glechomifolia* e as demais espécies utilizadas na medicina, como *V. officinalis* e *V. wallichii*.

Devido às divergências existentes em estudos encontrados na literatura em relação às moléculas bioativas contidas em fitoterápicos a base de *Valeriana*, e considerando as controvérsias em relação ao efeito dos valepotriatos, no Artigo 6 da presente tese objetivamos avaliar atividades biológicas *in vivo* de um extrato clorofórmico semipurificado de *V. glechomifolia*, contendo 96% dos valepotriatos valtrato, acevaltrato e diidrovaltrato, quantificados por CLAE. Neste trabalho, foram estudadas três doses da fração de valepotriatos isolados de *V. glechomifolia*: 1, 3 e 10mg/kg, administradas intraperitonealmente, em camundongos. A administração sistêmica da dose de 10mg/kg da fração de valepotriatos diminuiu estatisticamente (P menor que 0,05) as medições de locomoção, determinadas por meio do número de cruzamentos, e de comportamento exploratório, determinadas por meio do número de “rearings”, executados pelos camundongos no campo aberto, em relação ao grupo de animais tratado com o veículo, indicando possível efeito hipnótico/sedativo. A dose de 10mg/kg também aumentou a porcentagem de tempo dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, semelhantemente aos animais tratados com o benzodiazepínico clássico diazepam, utilizado como controle positivo, indicando propriedades sedativas e ansiolíticas. Essa dose, injetada 30 minutos antes do treino, não afetou a memória aversiva, uma memória emocional, avaliada no teste de esquiva inibitória e a memória de reconhecimento, uma memória de aprendizado simples, avaliada no teste reconhecimento de objeto novo.

A dose intermediária da fração de valepotriatos utilizada no estudo (3mg/kg), administrada sistemicamente em camundongos 30 minutos antes do treino, prejudicou a memória de longa duração na tarefa de reconhecimento de objeto, realizada 24 horas após o treino. Na menor e na maior dose testada (1 e 10mg/kg, respectivamente), não foram observados prejuízos na memória de reconhecimento de objeto. Uma curva característica de memória foi obtida no experimento de reconhecimento de objeto, em que as doses menores e maiores não apresentam, e a dose intermediária apresentou efeito.

Em suma, encontramos interessantes atividades biológicas de mangiferina e do extrato da casca da árvore de *Mangifera indica*, bem como dos valepotriatos isolados de *V. glechomifolia* nos modelos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*

testados, sendo que estas moléculas obtidas a partir dos produtos naturais estudados apresentam potencial uso clínico.

CONCLUSÃO

Abaixo estão apresentadas as principais atividades biológicas dos experimentos enfocando mangiferina e o extrato da casca da árvore de *Mangifera indica* (ECAM).

– A administração sistêmica de mangiferina, nas doses de 10, 50 ou 100mg/kg (i.p.), imediatamente após o treino na tarefa de reconhecimento de objeto (RO), resultou em melhora na consolidação dessa memória não espacial, quando testada 24h (LTM: memória de longa duração) após o treinamento de ratos;

– as mesmas doses de mangiferina administradas intraperitonealmente após o treino na esQUIVA inibitória (EI) prejudicaram a consolidação da memória aversiva, constatado no teste de LTM;

– a administração tardia de mangiferina (6h após o treino de RO ou EI) não afetou as memórias nessas tarefas, indicando seletividade temporal na consolidação da memória nos testes de EI e RO. O resultado da análise do comportamento dos animais no campo aberto após o tratamento com mangiferina demonstrou não afetar a locomoção (número de cruzamentos), o comportamento exploratório (número de “rearings”) e a ansiedade (latência e número de bolos fecais), bem como a motivação durante os treinos (tempos de exploração dos objetos e de descida da plataforma). Esses resultados indicam que a melhora induzida pela mangiferina na consolidação da LTM de RO não pode ser atribuída a alterações na função sensorio-motora;

– a microinfusão de mangiferina no hipocampo imediatamente após o treino na tarefa de RO resultou em melhora na consolidação dessa memória não espacial, quando testada 24h (LTM) após o treinamento de ratos, de maneira similar ao efeito observado na administração sistêmica. Já a infusão intra-amigdalár de

mangiferina não demonstrou diferença no aprendizado em comparação com o grupo controle;

- o efeito de piora na memória aversiva no teste de esQUIVA inibitória, após a administração sistêmica de mangiferina, não foi observado nas microinjeções no hipocampo ou na amígdala, podendo ser mediado por áreas cerebrais, como o córtex entorrinal, o córtex insular, ou o neocórtex;

- camundongos transgênicos (com um fenótipo de ataxia espinocerebelar do tipo 2) tratados cronicamente com mangiferina apresentaram aprendizado na tarefa de RO (comparação treino e teste); esse efeito não foi observado nos animais tratados com o extrato padronizado da casca de *M. indica* (ECAM). No teste da EI, os animais tratados com o ECAM apresentaram aprendizado (comparação treino e teste), e os camundongos atáxicos não tratados e tratados com mangiferina não apresentaram aprendizado;

- como mecanismo molecular mediador do efeito de melhora na tarefa de RO, encontramos o aumento da secreção celular de fatores neurotróficos (NGF e TNF- α) promovido por mangiferina.

Os principais resultados nos experimentos com valepotriatos isolados de *Valeriana glechomifolia* foram os seguintes:

- a inibição da viabilidade de células foi revertida pelo análogo 8-Br-AMPC, um ativador da via AMPC/PKA;

- a administração sistêmica de 10mg/kg de valepotriatos em camundongos diminuiu a locomoção e o comportamento exploratório no campo aberto e aumentou a porcentagem de tempo dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, indicando propriedades sedativas e ansiolíticas. Essa dose não afetou a memória aversiva e de reconhecimento de objeto;

Em suma, encontramos interessantes atividades biológicas de mangiferina e do extrato da casca *Mangifera indica*, e dos valepotriatos isolados de *V. glechomifolia* nos modelos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* testados.

OBRAS CONSULTADAS

ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Spending on new drug development. *Health Econ* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 130-41, Fev 2010.

ALBENSI, B. C.; MATTSON, M. P. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* [S.I.], v. 35, n. 2, p. 151-159, Fev 2000.

ALBERINI, C. M. Genes to remember. *J Exp Biol* [S.I.], v. 202, n. 21, p. 2887-91, Nov. 1999.

AMBROGI LORENZINI, C.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; SACCHETTI, B.; TASSONI, G. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 71, n. 1, p. 1-18, Jan 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6028*: resumos. Rio de Janeiro: 2003.

BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim* [S.I.], v. 28, n. 3, p. 193-211, Jul 1994.

BALLS, M.; FENTEM, J. Progress towards the validation of alternative tests. *ATLA* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 33-43, 1997.

BERMÚDEZ-RATTONI, F.; OKUDA, S.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem* [S.I.], v. 12, n. 5, p. 447-9, Set-Out 2005.

BHATTACHARYA, S. K.; SANYAL, A. K.; GHOSAL, S. Monoamine oxidase-inhibiting activity of mangiferin isolated from *Canscora decussata*. *Naturwissenschaften* [S.I.], v. 59, n. 12, p. 651, 1972.

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

BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; PRAS, N. Determination of valepotriates. *J Chromatogr A*, [S.l.], v. 967, n. 1, p. 131-46, Ago 2002.

BOUNTHANH, C.; BERGMANN, C.; BECK, J. P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med* [S.l.], v. 41, n. 1, p. 21-8, Jan 1981.

BRASIL. Lei n. 11794, de 8 de outubro de 2008. *Regulamenta o inciso VII do § 1 do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.* Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 10 jul. 2010.

BRASIL. CNS. Resolução CNS 251/97. *Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos.* Diário Oficial da União, p. 21117, 1997.

BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* [S.l.], v. 101, n. 40, p. 14515-20, Out 2004.

BRYNE, G. J. A. Treatment of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Aust J Hosp Pharm* [S.l.], v. 28, p. 261-6, 1998.

BÜRK, K.; GLOBAS, C.; BOSCH, S.; KLOCKGETHER, T.; ZUHLKE, C.; DAUM, I.; DICHGANS, J. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *J Neurol* [S.l.], v. 250, n. 2, p. 207-11, Fev 2003.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gaz Méd Bahia* v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

Canadian Council on Animal Care (CCAC). Disponível em: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Assessment/CCAC-CFHS_Manual_e.pdf. Acesso em: 09 ago 2010.

CANTRELL, A. R.; TIBBS, V. C.; WESTENBROEK, R. E.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Dopaminergic modulation of voltage-gated Na⁺ current in rat hippocampal neurons requires anchoring of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* [S.l.], v. 19, n. 17, p. RC21, Set 1999.

CARVALHO, C. M. B. *Otimização da micropropagação e estabelecimento de culturas de raízes de Valeriana glechomifolia Meyer.* Porto Alegre: UFRGS, 2003. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

CARVALHO, C. M. B.; MAURMANN, N.; LUZ, D. I.; FETT NETO, A. G.; RECH, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep* [S.l.], v. 23, n. 4, p. 251-5, 2004.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím Nova* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHANMAHASATHIEN, W.; LI, Y.; SATAKE, M.; OSHIMA, Y.; RUANGRUNGSI, N.; OHIZUMI, Y. Prenylated xanthenes with NGF-potentiating activity from *Garcinia xanthochymus*. *Phytochemistry* [S.I.], v. 64, n. 5, 981-6. Nov 2003.

CHOUDHARY, I. Back to Nature. *TWAS Supplement to Nature Publishing Group* [S.I.], p. 41, 2008.

CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* [S.I.], v. 20, n. 23, p. 8853-60, Dez 2000.

COBEA, 1991. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA). *Princípios éticos na experimentação animal*. Jul., p. 1, São Paulo, 1991. Disponível em: <<http://vsites.unb.br/ib/ceua/COBEA.htm>>. Acesso em: 09 ago 2010.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA). *Alternativas*. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=71>. Acesso em: 09 ago 2010.

DE LIMA, M. N.; LUFT, T.; ROESLER, R.; SCHRODER, N. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 405, n. 1-2, p. 142-6, Set 2006.

DE ROSA, R.; GARCIA, A. A.; BRASCHI, C.; CAPSONI, S.; MAFFEI, L.; BERARDI, N.; CATTANEO, A. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. [S.I.], v. 102, n. 10, 3811-6, Mar 2005.

DESHAIES, R. J. Drug discovery: Fresh target for cancer therapy. *Nature* [S.I.], v. 458, n. 7239, p. 709-10, Abr 2009.

DE TORRES, E. P.; LARRAURI, A. G.; KUHN, G. R. Ensayos alternativos a la experimentación animal. *Anim Exp* [S.I.], v. 3, n. 2, p. 30-6, 1997.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* [S.I.], v. 22, n. 2, p. 151-85, Mar 2003.

DOODY, R. S. Clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontology* [S.I.], v. 45 Suppl 1, p. 23-32, 1999.

EICHENBAUM, H.; SCHOENBAUM, G.; YOUNG, B.; BUNSEY, M. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 93, n. 24, p. 13500-7, Nov 1996.

EICHENBAUM, H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res* [S.l.], v. 103, n. 2, p. 123-33, Set 1999.

European Commission. 2006. *The SCCP's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation*. Scientific Committee on Consumer Products. 6th revision. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_03j.pdf. Acesso em: 10 ago 2010.

European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP). Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs. *Valeriana radix (valerian root)*. Exeter, UK, v. 4, p. 2-6, 1996-1997.

European Treaty Series. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes*. No. 170 revised (2005).

FARIAS, C. B.; LIMA, R. C.; LIMA, L. O.; FLORES, D. G.; MEURER, L.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* [S.l.], v. 75, n. 1-2, p. 27-31, Ago 2008.

FLICKER, C.; FERRIS, S. H.; CROOK, T.; BARTUS, R. T. A visual recognition memory test for the assessment of cognitive function in aging and dementia. *Exp Aging Res* [S.l.], v. 13, n. 3, p. 127-32, Out 1987.

FURASTÉ, P. A. *Normas Técnicas para o Trabalho Científico: elaboração e formatação. Explicitação das normas da ABNT*. 14.ed. Porto Alegre: [S.ed.], 2006.

GARCIA, D.; LEIRO, J.; DELGADO, R.; SANMARTIN, M. L.; UBEIRA, F. M. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytother Res* [S.l.], v. 17, n. 10, p. 1182-7, Dez 2003.

GARRIDO, G. G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCIA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Pharmacol Res* [S.l.], v. 50, n. 2, p. 143-9, Aug 2004a.

GARRIDO, G. G.; DELGADO, R.; LEMUS, Y.; RODRIGUEZ, J.; GARCIA, D.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG). Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacol Res* [S.l.], v. 50, n. 2, p. 165-72, Aug 2004b.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre* [S.l.], v. 1, p. 27, 2007.

GOODMAN, B. L.; GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. (11.Ed.). Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.

GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SANCHEZ-GOMEZ, M. V.; ALBERDI, E.; ARRANZ, A.; DELGADO-GARCIA, J. M.; GRUART, A.; MATUTE, C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 374-86, Aug 2006.

GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 443-51, Nov-Dez 1996.

HATTORI, A.; HAYASHI, K.; KOHNO, M. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates the production of nerve growth factor in fibroblasts via the 55-kDa type 1 TNF receptor. *FEBS Letters* [S.I.], v. 379, n. 2, p. 157-60, Jan 1996.

HENNIGAN, A.; CALLAGHAN, C. K.; KEALY, J.; ROUINE, J.; KELLY, A. M. Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 197, n. 2, p. 371-7, Fev 2009.

HOUGHTON, P. J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J Pharm Pharmacol* [S.I.], v. 51, n. 5, p. 505-12, Maio 1999.

IBARRETXE, G.; SANCHEZ-GOMEZ, M. V.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; ALBERDI, E.; MATUTE, C. Differential oxidative stress in oligodendrocytes and neurons after excitotoxic insults and protection by natural polyphenols. *Glía* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 201-11, Jan 2006.

ICHIKI, H.; MIURA, T.; KUBO, M.; ISHIHARA, E.; KOMATSU, Y.; TANIGAWA, K.; OKADA, M. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol Pharm Bull* [S.I.], v. 21, n. 12, p. 1389-90, Dez 1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* [S.I.], v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 103, n. 1, p. 1-11, Ago 1999.

IZQUIERDO, I. *Memória*. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002.

JUNG, K.; LEE, B.; HAN, S. J.; RYU, J. H.; KIM, D. H. Mangiferin ameliorates scopolamine-induced learning deficits in mice. *Biol Pharm Bull* [S.I.], v. 32, n. 2, p. 242-6, Fev 2009.

KNOLL, J. The pharmacology of selegiline ((-)-deprenyl). New aspects. *Acta Neurol Scand Suppl* [S.I.], v. 126: 83-91, 1989.

LEIRO, J.; ARRANZ, J. A.; YANEZ, M.; UBEIRA, F. M.; SANMARTIN, M. L.; ORALLO, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa

B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int Immunopharmacol* [S.I.], v. 4, n. 6, p. 763-78, Jun 2004.

LI, L.; HELLER-HARRISON, R.; CZECH, M.; OLSON, E. N. Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* [S.I.], v. 12, n. 10, p. 4478-85, Out 1992.

LI, J. W.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* [S.I.], v. 325, n. 5937, p. 161-5, Jul 2009.

LORENZINI, C. A.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; SACCHETTI, B.; TASSONI, G. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res* [S.I.], v. 730, n. 1-2, p. 32-9, Ago 1996.

MAHADY, G. B. Global harmonization of herbal health claims. *J Nutr* [S.I.], v. 131, n. 3s, p. 1120S-3S, Mar 2001.

MARCHIORO, M. K. *Avaliação in vitro da atividade antiproliferativa de extratos de Valeriana glechomifolia*. Porto Alegre: UFRGS, 2009. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; FERNÁNDEZ, S.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Beh* [S.I.], v. 75, n. 3, p. 537-45, Jun 2003.

MAURMANN, N.; LUZ, D.; CARVALHO, C. M. B.; RECH, S. B. Caracterização do crescimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 15, 2003.

MAURMANN, N. *Valeriana glechomifolia: crescimento e produção de valepotriatos em diferentes meios nutritivos e avaliação preliminar de atividade neurofarmacológica*. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

MAURMANN, N.; CARVALHO, C. M. B.; SILVA, A. L.; FETT NETO, A. G.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* [S.I.], v. 42, p. 50-53, Jan-Fev 2006.

MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* [S.I.], n. 44, n. 3, p. 209-215, Abr 2008.

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; RECH, S. B.; FETT-NETO, A. G.; ROESLER, R. A Valepotriate Fraction of *Valeriana glechomifolia* Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], Jan 2010.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. *Science* [S.I.], v. 153, n. 742, p. 1351-8, Set 1966.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science* [S.I.], v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 2000.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 27, p. 1-28, 2004.

MCINTOSH, A. R.; GONZALEZ-LIMA, F. Large-scale functional connectivity in associative learning: interrelations of the rat auditory, visual, and limbic systems. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 80, n. 6, p. 3148-62, Dez 1998.

MELLO E SOUZA, T.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, I. Involvement of the medial precentral prefrontal cortex in memory consolidation for inhibitory avoidance learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* [S.I.], v. 66, n. 3, p. 615-22, Jul 2000.

MIRANDA, E.; HOSSNE, W. S. Ensaio clínico (fase III) – perfil das publicações científicas. Aspectos bioéticos. *Rev Bras Clín Med* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 143-7, 2010.

MISSALE, C.; NASH, S. R.; ROBINSON, S. W.; JABER, M.; CARON, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* [S.I.], v. 78, n. 1, p. 189-225, Jan 1998.

MIURA, T.; TAKASUGI, E.; KUNO, Y. Matter effect to T violation at a neutrino factory. *Phys Res D* [S.I.], v. 64, n. 1, p. 013002/1-14, Maio 2001.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quím Nova* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 105-11, Jan-Fev 2001.

NIEWIADOMSKA, G.; BAKSALERSKA-PAZERA, M.; GASIOROWSKA, A.; MIETELSKA, A. Nerve growth factor differentially affects spatial and recognition memory in aged rats. *Neurochem Res* [S.I.], v. 31, n. 12, p. 1481-90, 2006.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VELEZ CASTRO, H. T.; AGUERO-AGUERO, J.; GONZALEZ-GONZALEZ, J.; NADDEO, F.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J Agric Food Chem* [S.I.], v. 50, n. 4, p. 762-6, Feb 2002.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; GARRIDO, G. G.; GARCIA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCIA, M.; PARDO-ANDREU, G. L. The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 351-8, May 2007.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. *Curso de Manipulação de Animais de Laboratório*. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; VELHO, J. A.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 439, n. 2, p. 184-93, Jul 2005a.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; VELHO, J. A.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 513, p. 47-55, 2005b.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; NUNEZ-SELLES, A. J.; VERCESI, A. E. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 53, n. 3, p. 253-60, Mar 2006a.

PARDO-ANDREU, G. L.; SANCHEZ-BALDOQUIN, C.; AVILA-GONZALEZ, R.; DELGADO, R.; NAAL, Z.; CURTI, C. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 547, n. 1-3, p. 31-6, Out 2006b.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M. F.; CURTI, C.; HERNANDEZ, I.; MERINO, N.; LEMUS, Y.; MARTINEZ, I.; RIANO, A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 79-86, Jan 2008a.

PARDO-ANDREU, G. L.; PAIM, B. A.; CASTILHO, R. F.; VELHO, J. A.; DELGADO, R.; VERCESI, A. E.; OLIVEIRA, H. C. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacol Res* [S.I.], v. 57, n. 5, p. 332-8, Maio 2008b.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. R.; FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; ROESLER, R. Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 635, n. 1-3, p. 124-8, Jun 2010.

PETHERICK, A. High hopes for Brazilian science. *Nature* [S.I.], v. 465, n. 7299, p. 674-5, Jun 2010.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* [S.I.], v. 56, n. 3, p. 237-43, Fev 2001.

PhRMA, 2005. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. *What goes into the cost of prescription drugs? ...and Other Questions About Your Medicines*. Disponível em:

<http://www.phrma.org/files/attachments/Cost_of_Prescription_Drugs.pdf>. Acesso em: 09 ago 2010.

POREMBA, A.; GABRIEL, M. Amygdala efferents initiate auditory thalamic discriminative training-induced neuronal activity. *J Neurosci* [S.I.], v. 21, n. 1, 270-8, Jan 2001.

PPGBCM/UFRGS. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Manual para a apresentação de dissertações de mestrado e teses de doutorado*. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/ppgbcm/download/manual_teses_e_dissertacoes.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2010.

PREISLER, T.; MARTINS, M. R.; PARDO-ANDREU, G. L.; HENRIQUES, J. A.; QUEVEDO, J.; DELGADO, R.; ROESLER, R. *Mangifera indica* extract (Vimang) impairs aversive memory without affecting open field behaviour or habituation in rats. *Phytother Res* [S.I.], v. 23, n. 6, p. 859-62, Jun 2009.

PURDY, K. S.; MCMULLEN, P. A.; FREEDMAN, M. Changes to the object recognition system in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn* [S.I.], v. 49, n. 2, 213-6, Jul 2002.

QUEVEDO, J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F. R.; MARTINS, M. R.; ROESLER, R. Consolidação da memória e estresse pós-traumático. *Rev Bras Psiquiatr* [S.I.], v. 25, n. 1, p. 25-30, Jun 2003.

RINNE, J. O.; ROYOTTA, M.; PALJARVI, L.; RUMMUKAINEN, J.; RINNE, U. K. Selegiline (deprenyl) treatment and death of nigral neurons in Parkinson's disease. *Neurology* [S.I.], v. 41, n. 6, p. 859-61, Jul 1991.

RISPOLI, V.; MARRA, R.; COSTA, N.; ROTIROTI, D.; TIRASSA, P.; SCIPIONE, L.; DE VITA, D.; LIBERATORE, F.; CARELLI, V. Choline pivaloyl ester enhances brain expression of both nerve growth factor and high-affinity receptor TrkA, and reverses memory and cognitive deficits, in rats with excitotoxic lesion of nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* [S.I.], v. 190, n. 1, p. 22-32, Jun 2008.

ROESLER, R.; MCGAUGH, J. L. Memory Consolidation. In: KOOB, G. F.; LE MOAL, M.; THOMPSON, R. F. (eds.). *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, v. 2, p. 206-14. Oxford: Academic Press, 2010.

ROOZENDAAL, B.; OKUDA, S.; VAN DER ZEE, E. A.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 103, n. 17, p. 6741-6, Mar 2006.

RUSSOWSKI, D. *Produção de valepotriatos em culturas líquidas de plantas de Valeriana glechomifolia Meyer (Valerianaceae)*. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Tese (Programa de Pós-Graduação em em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006a.

RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana*

glechomifolia whole plant liquid cultures. *Plant Cell, Tiss Organ Cult* [S.I.], v. 86, n. 2, p. 211-8, Jul 2006b.

SALLES, L. A.; A, L. S.; RECH, S. B.; ZANATTA, N.; VON POSER, G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem Syst Ecol* [S.I.], v. 28, n. 9, p. 907-10, Nov 2000.

SALLES, L. A.; SILVA, A. L.; FETT NETO, A. G.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates. *Plant Sci* [S.I.], v. 163, n. 1, p. 165-8, Jul 2002.

SCHIAVETTO, A.; KOHLER, S.; GRADY, C. L.; WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M. Neural correlates of memory for object identity and object location: effects of aging. *Neuropsychologia* [S.I.], v. 40, n. 8, p. 1428-42, 2002.

SATO, T.; KAWAMOTO, A.; TAMURA, A.; TATSUMI, Y.; FUJII, T. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). *Chem Pharm Bull* [S.I.], v. 40, n. 3, p. 721-4, Mar 1992.

SILVA, A. J. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J Neurobiol* [S.I.], v. 54, n. 1, p. 224-37, Jan 2003.

SMITH, R. D.; GOLDIN, A. L. Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *J Neurosci* [S.I.], v. 17, n. 16, p. 6086-93, Ago 1997.

SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* [S.I.], v. 24, p. 1217-81, 2001.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem* [S.I.], v. 13, n. 21, p. 5892-908, Nov 2005.

SVENNINGSSON, P.; NISHI, A.; FISONE, G.; GIRAULT, J. A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [S.I.], v. 44, p. 269-96, 2004.

TOMIC, M.; TOVILOVIC, G.; BUTOROVIC, B.; KRSTIC, D.; JANKOVIC, T.; ALJAN, I.; MENKOVIC, N. Neuropharmacological evaluation of diethylether extract and xanthones of *Gentiana kochiana*. *Pharmacol Biochem Behav* [S.I.], v. 81, n. 3, p. 535-42, Jul 2005.

TONEGAWA, S.; NAKAZAWA, K.; WILSON, M. A. Genetic neuroscience of mammalian learning and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [S.I.], v. 358, n. 1432, p. 787-95, Abr 2003.

TREVISAN, M. T. S. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 26, n. 3, Maio 2003.

TYLER, V. E. *Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytochemicals*. New York, NY: Pharmaceutical Products Press, p. 118, 1994.

YOSHIMI, N.; MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; QIAO, Z.; HARA, A.; YAMAHARA, J.; MORI, H. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Lett* [S.I.], v. 163, n. 2, p. 163-70, Fev 2001.

ZHANG, M. Q.; WILKINSON, B. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Curr Opin Biotechnol* [S.I.], v. 18, n. 6, p. 478-88, Dez 2007.

ZHENG, M. S.; LU, Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chin Med J* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 160-5, Fev 1990.

PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DE TRABALHO

Nos estudos envolvendo o extrato de *M. indica* e mangiferina, pretendemos:

- investigar a região cerebral responsável pela piora da memória de esquiva inibitória induzida por mangiferina e estudar os mecanismos moleculares fundamentais para essa atividade;
- avaliar o efeito da administração sistêmica de mangiferina e do ECAM na neuroproteção.

Com os valepotriatos, espera-se:

- avaliar outros tempos e concentrações de ativadores da via AMPc/PKA, bem como moduladores da via PKC;
- dar continuidade aos experimentos de genotoxicidade e mutagenese (experimentos prévios demonstraram que as menores doses apresentaram efeito protetor à formação de cauda no ensaio cometa);
- dar continuidade aos experimentos de avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo (experimentos piloto demonstraram que valepotriatos preveniram danos oxidativos a lipídeos no cérebro, sem efeito no fígado e rim);
- dar continuidade aos testes farmacotécnicos de confecção e quantificação nanocápsulas e nanoemulsões.

APÊNDICE A

NATASHA MAURMANN

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Natasha Maurmann

Local e data de nascimento: Fortaleza, Ceará, Brasil – 15/11/1980.

Endereço profissional:

Rua Sarmento Leite, Campus do Centro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, n. 500, sala 211. Centro (CEP 90050-170) Porto Alegre, RS, Brasil (Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Instituto de Ciências Básicas da Saúde)

Avenida Bento Gonçalves, Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, n. 9500. Agronomia (CEP 91501-970), Porto Alegre, RS, Brasil (PPGBCM).

Telefone profissional: (51) 3308-3654

Fax: (51) 36511124

E-mail: natasha.maurmann@ufrgs.br

2 FORMAÇÃO

Graduação em Farmácia (UFRGS, 1999-2003)

Ênfase em Farmácia Industrial (UFRGS, 2004-2008)

Mestrado no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM (UFRGS, 2005-2006).

Doutorado no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM (UFRGS, 2006-2010).

3 ESTÁGIOS

BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

– Título do projeto: “Estudo do estabelecimento de culturas *in vitro* de *Valeriana glechomifolia* e verificação da produção de valepotriatos”

Professor orientador: Dra. Sandra Beatriz Rech

Período: agosto/2000 a abril/2002

Local: Laboratório de Biotecnologia Vegetal / Faculdade de Farmácia / UFRGS

Órgão financiador: FAPERGS

– Título do projeto: “Estudo do estabelecimento e análise fitoquímica de culturas celulares de *Valeriana glechomifolia*”

Professor orientador: Dra. Sandra Beatriz Rech
 Período: maio/2002 a 2004
 Local: Laboratório de Biotecnologia Vegetal / Faculdade de Farmácia / UFRGS
 Órgão financiador: CNPq/UFRGS
 – Estágio curricular:
 Professores responsáveis: Dra. Denise Bueno e Dra. Tânia Alves Amador
 Período: agosto/2003 a janeiro/2004
 Profissional orientador: Farm. Marcelo Grocetti
 Local: Farmácia Clinifarma

MESTRADO

Título: *Valeriana glechomifolia*: crescimento e produção de valepotriatos em diferentes meios nutritivos e avaliação preliminar da atividade neurofarmacológica.
 Professor orientador: Dr. Arthur Germano Fett Neto
 Professor coorientador: Dra. Sandra Beatriz Rech
 Período: março/2005 a ago/2006
 Local: Laboratório de Fisiologia Vegetal / Departamento de Botânica / UFRGS
 Órgão financiador: CAPES

DOUTORADO

Título: Avaliação pré-clínica de atividades biológicas de moléculas de *Mangifera indica* e de *Valeriana glechomifolia*
 Professor orientador: Dr. Rafael Roesler
 Professor coorientador: Dr. Arthur Germano Fett Neto
 Período: setembro/2006 a agosto/2010
 Local: Laboratório de Neurofarmacologia Molecular/ Departamento de Farmacologia / UFRGS e Laboratório de Pesquisa em Câncer / Centro de Pesquisa Experimental / Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE/HCPA)
 Órgão financiador: CAPES

4 PRÊMIOS E DISTINÇÕES

MAURMANN, N. Seleção e bolsa de U\$600,00 para a Escola Latino-Americana de Genética Humana e Médica (ELAG). *Latin American School of Human and Medical Genetics (LASG/ELAG)*, 2010. Caxias do Sul, Brasil.

MAURMANN, N.; PARDO-ANDREU, G. L. P.; REOLON, G. K.; ALMEIDA, V.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Administration of *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin impairs aversive memory but improves object recognition index in rats. In: *Immunopharmacology*, 2008. Matanzas, Cuba. Award for the elevated quality, scientific rigor and for the excellent carried out presentation of the work.

BIANCINI, G. B.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Efeito da concentração de nutrientes no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *XXVII Concurso acadêmico de Pesquisa Científica (CAPEC), XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos (SAEF), Faculdade de Farmácia/UFRGS*, 2006. Classificado em segundo lugar.

HAAS, J. S.; BERNARDES, A. P. M.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; POSER, G. L. V. Avaliação Química e Quantitativa de Compostos Fenólicos em *Hypericum polyanthemum*. In: *XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica, Pró-reitoria de Pesquisa/UFRGS*, 2005. Destaque da Sessão.

LUZ, D. I.; MAURMANN, N.; CARVALHO, C. M. B.; RECH, S. B. Desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *XXIV Concurso acadêmico de Pesquisa Científica (CAPEC)*,

realizado na XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia/UFRGS, 2003. Classificado em segundo lugar.

5 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G.; ROESLER, R. A Valepotriate Fraction of *Valeriana glechomifolia* Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2010 (Online), p. 1-7.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; DE FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2010. v. 635, p. 124-8.

PINHATTI, A. V.; NUNES, J. M.; MAURMANN, N.; GONÇALVES, L. M. R.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Phenolic compounds accumulation in *Hypericum ternum* propagated *in vitro* and during plant development acclimatization. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2010. v. 32, p. 675-81.

MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 2008. v. 44, p. 209-15.

BERNARDI, A. P. M.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; VON POSER, G. L. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007. v. 29, p. 165-70.

MAURMANN, N.; CARVALHO, C. M. B.; SILVA, A. L.; FETT NETO, A. G.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2006. v. 42, p. 50-3.

RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006. v. 86, p. 211-8.

CARVALHO, C. M. B.; MAURMANN, N.; LUZ, D. I.; FETT NETO, A. G.; RECH, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Reports*, 2004. v. 23, p. 251-5.

LUZ, D. I.; MAURMANN, N.; CARVALHO, C. M. B.; RECH, S. B. Desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. *Caderno de Farmácia*, 2003. v. 9, n. 2, p. 89-92.

6 RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

JOBIM, P. F. C.; DOS SANTOS, C. E. I.; REOLON, G. K.; MAURMANN, N.; PEDROSO, T. R.; MARCONDES, N. A.; WERENICZ, A.; PAIM, L.; ROESLER, R.; DIAS, J. F. Investigation of long-term-memory formation using Particle-Induced X-ray Emission. In: *PIXE conference*, 2010. London.

JOBIM, P. F. C.; PAIM, L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; PEDROSO, T. R.; MARCONDES, N. A.; WERENICZ, A.; ROESLER, R. Papel da mTOR na consolidação da memória aversiva de esquiava inibitória em ratos. In: *XXV Reunião anual da FeSBE*, 2010. Águas de Lindóia, SP.

MAURMANN, N.; MARCONDES, N. A.; WERENICZ, A.; PAIM, L. M. G.; PEDROSO, T.; JOBIM, P. F. C.; REOLON, G. K.; ROESLER, R. Efeito da administração intra-amigdalar de mangiferina na memória de reconhecimento de objeto em ratos. In: *6º Congresso Brasileiro de Cérebro, Comportamento e Emoções*, 2010. Gramado, RS.

PAIM, L.; MAURMANN, N.; MARCONDES, N. A.; PEDROSO, T. R.; WERENICZ, A.; CHRISTOFF, R. R.; JOBIM, P. F. C.; REOLON, G. K.; ROESLER, R. Efeito da administração intra-hipocampal do extrato de *Mangifera indica* na consolidação da memória de reconhecimento de objeto e da memória

aversiva em ratos. In: *XXV Reunião anual da FeSBE*, 2010. Águas de Lindóia, SP.

ROESLER, R.; MAURMANN, N.; HECKTHEUER, S. R.; REOLON, G. K.; PEDROSO, T.; JOBIM, P. F. C.; WERENICZ, A.; MARCONDES, N. A.; PAIM, L. M. G.; GOULART, B. K. Memory enhancement by cisplatin in rats. In: *6º Congresso Brasileiro de Cérebro, Comportamento e Emoções*, 2010. Gramado, RS.

WERENICZ, A.; REOLON, G. K.; MAURMANN, N.; MARCONDES, N. A.; PEDROSO, T. R.; JOBIM, P. F. C.; PAIM, L. M. G.; ROESLER, R. Efeito da inibição de histonas desacetilases na memória de reconhecimento de objeto em ratos velhos. In: *XXV Reunião anual da FeSBE*, 2010. Águas de Lindóia, SP.

MARCONDES, N. A.; WERENICZ, A.; RODRIGUES, F. F.; PARDO-ANDREU, G. L. P.; REOLON, G. K.; MAURMANN, N.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Efeito da administração intra-hipocampal de mangiferina sobre a consolidação da memória aversiva em ratos. In: *XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS*, 2009, Porto Alegre, RS.

WERENICZ, A.; RODRIGUES, F. F.; REOLON, G. K.; MARCONDES, N. A.; MAURMANN, N.; JOBIM, P. F. C.; PEDROSO T. R.; ROESLER, R. Efeito da inibição de histonas desacetilases no hipocampo dorsal na memória aversiva em ratos. In: *XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS*, 2009. Porto Alegre, RS.

PARDO-ANDREU, G. L. P.; FARIAS, C. B.; MAURMANN, N.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Effect of *Mangifera indica* L extract (Vimang) on human lung (H460) and colon (HT-29) tumor cells proliferation. In: *Immunopharmacology*, 2008. Matanzas, Cuba: Sociedade Cubana de Farmacologia.

MAURMANN, N.; PARDO-ANDREU, G. P.; REOLON, G. K.; ALMEIDA, V.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Administration of *Mangifera indica* stem bark extract and mangiferin impairs aversive memory but improves object recognition index in rats. In: *Immunopharmacology*, 2008. Matanzas, Cuba: Sociedade Cubana de Farmacologia.

MAURMANN, N.; PARDO-ANDREU, G. L.; REOLON, G. K.; ALMEIDA, V.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Administration of *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin impairs aversive memory but improves object recognition index in rats. In: *Immunopharmacology*, 2008. Matanzas, Cuba: Sociedade Cubana de Farmacologia.

MAURMANN, N.; FARIAS, C. B.; REOLON, G. K.; ALMEIDA, V.; PARDO-ANDREU, G.L.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Efeitos da mangiferina e do extrato do caule da casca de *Mangifera indica* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. In: *Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*, 2008. Porto Alegre, RS.

MAURMANN, N.; LEMUS, Y. M.; AMADOR, A. G.; HEREDIA, L. A.; PARDO-ANDREU, G. L.; ROESLER, R.; DELGADO, R. Effect of the *Mangiferin indica* L. extract (MiE) in aversive and declaratives memories of spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) transgenic mice. In: *XX Simposio de Plantas Medicinais do Brasil e X Internation Congress of Ethnopharmacology*, 2008. São Paulo, SP.

NUNES, J. M.; MAURMANN, N.; POSER, G. L. V.; RECH, S. B. Uliginosin B accumulation in *ex vitro* acclimatized plants of *Hypericum polyanthemum*. In: *XX Simposio de Plantas Medicinais do Brasil e X Internation Congress of Ethnopharmacology*, 2008. São Paulo, SP.

MAURMANN, N.; FARIAS, C. B.; PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; ROESLER, R. Efeito de mangiferina sobre a proliferação de células tumorais humanas de glioblastoma. In: *XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica*, 2008. Gramado, RS.

REOLON, G. K.; MAURMANN, N.; PEDROSO, T.; MARCONDES, N. A.; LIMA, D. B.; ROESLER, R. Effects of Sodium Butyrate, a Histone Deacetylases Inhibitor, on Novel Object Recognition Memory in Rats. In: *Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*, 2008. Porto Alegre, RS.

KRAI, J. S.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; TESTA, N. L.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G.; ROESLER, R. Effect of valepotriate extract of *Valeriana glechomifolia* in the elevated plus-maze in mice. In: *VII Jornada Farmaceutica da Univali; II Simposio Ibero-americano de plantas medicinais e VII ciclo de atualização em investigações quimico-farmacuticas*, 2007. Itajaí, SC.

MARCHIORO, M. K.; MAURMANN, N.; RUSSOWSKI, D.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriates production in extend period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. In: *XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, 2007. Gramado, RS. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2007. v. 19.

MARCHIORO, M. K.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Efeito de agentes estressantes no crescimento e acúmulo de valepotriatos em plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*, 2007. Porto Alegre, RS.

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; TESTA, N. L.; KRAI, J. S.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G.; ROESLER, R. Efeito de um extrato de valepotriatos de *Valeriana glechomifolia* no labirinto em cruz elevado em camundongos. In: *Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*, 2007. Porto Alegre, RS.

MAURMANN, N.; VIDAL, L. F.; STRECK, E.; BIANCINI, G. B.; MARCHIORO, M. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Efeito da Composição Nutricional do Meio de Cultura em Plântulas de *Valeriana glechomifolia* Cultivadas por Período Prolongado. In: *Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*, 2007. Porto Alegre, RS.

MAURMANN, N.; VIDAL, L. F.; STRECK, E.; BIANCINI, G. B.; MARCHIORO, M. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Role of nutrient medium composition on growth characteristic and valepotriate production in *Valeriana glechomifolia* extended period cultures. In: *VII Jornada Farmaceutica da Univali; II Simposio Ibero-americano de plantas medicinais e VII ciclo de atualização em investigações quimico-farmacuticas*, 2007. Itajaí, SC.

RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; MARCHIORO, M. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Signaling molecules and ultrasound elicit valepotriate production in whole-plant liquid culture of *Valeriana glechomifolia*. In: *XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, 2007. Gramado, RS. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2007. v. 19.

MARCHIORO, M. K.; BIANCINI, G. B.; VIDAL, L. F.; FETT NETO, A. G.; MAURMANN, N.; RECH, S. B. Efeito da concentração de nutrientes no desenvolvimento *in vitro* de plantulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *XVIII Salão de Iniciação Cientifica*, 2006, Porto Alegre. Pró-Reitoria de Pesquisa - PROPESQ, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; TESTA, N. L.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G.; ROESLER, R. Avaliação Preliminar da Atividade Neurofarmacol gica de um Extrato Clorofórmico de *Valeriana glechomifolia* em camundongos. In: *VIII Reunião Anual do Programa de Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS*, 2006. Porto Alegre, RS. Livro de Resumos do PPGBCM, p. 60.

MAURMANN, N.; MARCHIORO, M. K.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Biomass and Valepotriate Production in Micropropagated *Valeriana glechomifolia* Grown in Different Nutrient Media for Long Term Stock Culture Maintenance. In: *VIII Reunião Anual do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS*, 2006. Porto Alegre, RS. Livro de resumos do PPGBCM, p. 61.

MAURMANN, N.; MARCHIORO, M. K.; VIDAL, L. F.; RUSSOWSKI, D.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Efeitos de agentes estressantes no crescimento e acúmulo de valepotriatos em plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *57 Congresso Nacional de Botânica e 13 Encontro Estadual de Botânicos*, 2006, Gramado, RS.

PEDROLLO, C.; RUSSOWSKI, D.; MARCHIORO, M. K.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Produção de valepotriatos e compostos fenólicos em plântulas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas *in vitro*. In: *57 Congresso Nacional de Botânica*, 2006. Gramado, RS.

BERNARDES, A. P. M.; MAURMANN, N.; HAAS, J. S.; RECH, S. B.; POSER, G. L. V. Estabelecimento de culturas de calos de *Hypericum myrianthum*. In: *V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia*, 2005. Recife, PE.

BERNARDES, A. P. M.; LUZ, D.; MAURMANN, N.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. *In vitro* propagation and chemical characterization of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt. In: *In Vitro Biology Meeting*, 2005. Meeting of the Society for *In Vitro* Biology. Baltimore, EUA.

HAAS, J. S.; BERNARDES, A. P. M.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; POSER, G. L. V. Avaliação Química e Quantitativa de Compostos Fenólicos em *Hypericum polyanthemum*. In: *XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica*, 2005. Porto Alegre: Editora da UFRGS.

MAURMANN, N.; VIDAL, L. F.; STRECK, E.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Efeito da concentração de sais no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia*, 2005. Recife, PE.

RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Whole-plant liquid culture and valepotriate accumulation by *Valeriana glechomifolia*. In: *XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal e X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, 2005. Recife. Campinas: SBFV, v. 1.

VIDAL, L. F.; MAURMANN, N.; RECH, S. B. Estudos Preliminares de Aclimação Fotossintética e Crescimentos de Plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica*, 2005. Porto Alegre: Editora da UFRGS.

LUZ, D.; MARIOTTI, K. C.; MAURMANN, N.; RECH, S. B. Estudo comparativo do desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia* em meios semi-sólido e líquido de cultura. In: *Livro de resumos do XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica*, 2004. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 16:514-515.

MARIOTTI, K. C.; LUZ, D.; MAURMANN, N.; RUSSOWSKI, D.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Estudo comparativo do desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia* em meio semi-sólido e líquido de cultura. In: *XII Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM*, 2004. Curitiba, PR.

MAURMANN, N.; LUZ, D.; MARIOTTI, K. C.; RECH, S. B. Estudo preliminar da exudação de valepotriatos de plântulas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas em meio líquido frente a diferentes agentes permeabilizantes. In: *Livro de resumos do XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica*, 2004. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 16:512-513.

MAURMANN, N.; RECH, S. B. Estudo da exsudação de valepotriatos e da sobrevivência de plântulas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas em meio líquido frente a diferentes agentes permeabilizantes. *Revista Caderno de Farmácia*, 2004. 20(1):69-70.

RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; LUZ, D.; RECH, S. B.; FETT NETO, A. G. Estudo da produção de valepotriatos em plântulas de *Valeriana glechomifolia* clonadas em meio líquido. In: *50 Congresso Brasileiro de Genética*, 2004. Florianópolis, SC.

MARIOTTI, K. C.; LUZ, D.; MAURMANN, N.; RECH, S. B. Desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: *Livro de Resumos do XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica da UFRGS*, 2003. Porto Alegre: Editora da Universidade, 15:654.

MAURMANN, N.; LUZ, D.; CARVALHO, C. M. B.; RUSSOWSKI, D.; VON POSER, G. L.; FETT NETO, A. G.; RECH, S. B. Propagação *in vitro* de *Valeriana glechomifolia* e produção de valepotriatos. In: *XI Jornadas de Jovens Investigadores de AUGM*, 2003. Associação das Universidades do Grupo de Montevideo, La Plata, 1:360.

MAURMANN, N.; BERNARDES, A. P. M.; LUZ, D.; FERRAZ, A.; POSER, G. L. V.; RECH, S. B. Influência de reguladores de crescimento na indução de calos em explantes foliares de *Hypericum ternum*. In: *IV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2003*. Salvador, BA.

MAURMANN, N.; LUZ, D.; CARVALHO, C. M. B.; RUSSOWSKI, D.; VON POSER, G. L.; FETT NETO, A. G.; RECH, S. B. Caracterização do crescimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia*. In: *IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2003*. Atibaia, SP. 1:26.

MAURMANN, N. ; LUZ, D.; CARVALHO, C. M. B.; VON POSER, G. L.; FETT NETO, A. G.; RECH, S. B. Análise do crescimento e da produção de valepotriatos em plântulas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia*. In: *IV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2003*. Salvador, BA. 1:FG4.

MAURMANN, N.; LUZ, D.; CARVALHO, C. M. B.; RECH, S. B. Caracterização do crescimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2003*. v. 15.

NOR, C.; BERNARDES, A. P. M.; LUZ, D.; FERRAZ, A.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; VON POSER, G. L. Identificação de substâncias de *Hypericum ternum* in natura e de culturas *in vitro*. In: *Livro de Resumos do XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica da UFRGS, 2003*. Porto Alegre: Editora da Universidade. 15:655.

BERNARDES, A. P. M.; MAURMANN, N.; FERRAZ, A.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Micropropagação de *Hypericum ternum* A. St. Hil. In: *XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2002*. Cuiabá, MT.

BERNARDES, A. P. M.; ALBRING, D. V.; FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; POSER, G. L. V. Propagação *in vitro* de *Hypericum ternum* A. St. Hill e análise química das plântulas produzidas. In: *Livro de resumos do XIV Salão de Iniciação Científica e XI Feira de Iniciação Científica da UFRGS, 2002*. 14:503.

CARVALHO, C. M. B.; MAURMANN, N.; LUZ, D.; FETT NETO, A. G.; RECH, S. B. Otimização da micropropagação e enraizamento de *Valeriana glechomifolia* Meyer. In: *XVII simpósio de plantas medicinais do Brasil, 2002*. Cuiabá, MT.

CARVALHO, C. M. B.; MAURMANN, N.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Estabelecimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia* Meyer. In: *XVII simpósio de plantas medicinais do Brasil, 2002*. Cuiabá, MT.

MAURMANN, N.; CASTRO, A. P. S.; RECH, S. B.; VON POSER, G. L.; SILVA, A. L. Influência de reguladores de crescimento na produção *in vitro* de valepotriatos em suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia* Meyer. In: *XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002*. Porto Alegre, RS.

8. DEMAIS PROJETOS

– Coorientação do Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) da aluna Mariana Kliemann Marchioro: Avaliação *in vitro* da atividade anti-proliferativa de extratos de *Valeriana glechomifolia*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
Orientadora: Dra. Sandra Beatriz Rech

– Colaboração no Projeto da Faculdade de Farmácia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Cultivo *in vitro* e propagação de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul (2003-2014).
Professor Responsável: Dra. Sandra Beatriz Rech

– Colaboração no Projeto FIPE/HCPA 08-047: Avaliação pré-clínica da interação de neurotrofinas com o extrato de *Mangifera indica* (Vimang) em linhagens celulares de câncer humano.
Professor Responsável: Dr. Rafael Roesler

– Colaboração no Projeto FIPE/HCPA 09-641: Avaliação do papel da proteína mTOR hipocampal e amigdalar na consolidação, reconsolidação e extinção da memória aversiva de esQUIVA inibitória em ratos.

Professor Responsável: Dr. Rafael Roesler

– Colaboração no Projeto FIPE/HCPA 10-0071: Investigação da variação de macro e micro elementos no processo de consolidação da memória aversiva de ratos.

Professor Responsável: Dr. Rafael Roesler

– Colaboração no Projeto FIPE/HCPA 10-0072: Importância da síntese de mRNA na amígdala durante a consolidação e reconsolidação da memória de esQUIVA inibitória em ratos.

Professor Responsável: Dr. Rafael Roesler

– Colaboração no Projeto FIPE/HCPA 10-0073: Avaliação da administração de butirato sódico e tricostatina A (inibidores de histonas desacetilases) durante a pré-exposição ao contexto na memória de esQUIVA inibitória em ratos.

Professor Responsável: Dr. Rafael Roesler

– Colaboração no Projeto FIPE/HCPA 10-0253: Efeito do extrato de graviola na cicatrização cutânea de ratos.

Professor Responsável: Dr. Gilberto Schwartzmann

– Colaboração no Projeto FIPE/HCPA 10-0280: Receptores de neuropeptídeos como alvos terapêuticos nos transtornos de ansiedade e disfunção da memória: um estudo em ratos.

Professor Responsável: Dr. Rafael Roesler

– Colaboração no Projeto do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEPA/UFRGS 17-903): Mangiferina e Vimang®: avaliação pré-clínica da administração intracerebral sobre a memória na tarefa de reconhecimento de objeto novo e na tarefa de esQUIVA inibitória e avaliação da administração sistêmica na neuroproteção.

Professor Responsável: Dr. Rafael Roesler

– Colaboração no Projeto Pesquisa Translacional em Medicina do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT).

Professores Responsáveis: Dr. Flavio Kapsinsky/Dra. Nadja Shoröder