

Universidade Federal do ABC

Atividade neuroprotetora de produtos naturais, de princípios ativos e investigação dos seus mecanismos de ação

Prof. Fúlvio Rieli Mendes

**Proposta de projeto de pesquisa,
como parte do Pós-doutorado
a ser realizado na Universidade da Flórida**

Supervisor:

Prof Sylvain Doré

Santo André, Abril de 2014

RESUMO

Entre as doenças neurodegenerativas ligada a idade, a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) podem ser citadas como das mais incapacitantes. A terapêutica farmacológica hoje existente consiste principalmente no uso de agentes que aumentam os sistemas de transmissão afetados, seja pelo uso de inibidores da acetilcolinesterase, enzima que metaboliza a acetilcolina (na DA); ou L-dopa e outros agentes que aumentam a síntese e disponibilidade de dopamina (na DP). Como o estresse oxidativo é um componente importante no desenvolvimento destas doenças, agentes antioxidantes são promissores agentes profiláticos. Diversos compostos com ação anticolinesterásica e antioxidantes já foram isolados de plantas, como a galantamina e huperzina. Por outro lado, apesar do Brasil possuir uma das maiores biodiversidades do mundo, suas plantas ainda foram pouco exploradas no que se refere ao aproveitamento de seu potencial farmacológico. Este projeto irá avaliar o efeito antioxidante, ação sobre as enzimas acetilcolinesterase, monoaminoxidase, entre outros testes a serem definidos, para plantas medicinais brasileiras e seus princípios ativos.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) are some of the most disabling neurodegenerative pathologies. The current pharmacological therapeutic consists mainly on use of drugs that increase their neurotransmitter systems, by the use of acetylcholinesterase inhibitors, to blockade the enzyme that metabolizes the acetylcholine (in AD); or L-dopa and other agents that increase the synthesis and contents of dopamine (in PD). Since the oxidative stress is an important factor on the progress of these diseases, antioxidative agents are potential prophylactic drugs. Several compounds with antioxidant and anticholinesterasic activity were isolated from plants, as the case of galanthamine and huperzine. On the other hand, despite of Brazil has one of the highest biodiversity of the world, its plants were only superficially studied as regards its pharmacological potential. This project will evaluate the *in vitro* antioxidant effect and the action on the enzymes acetylcholinesterase, monoaminoxidase, among other tests to be defined, for Brazilian medicinal plants and their active principles.

INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas, juntamente com outros distúrbios causadores de danos cerebrais, como isquemia e acidente vascular cerebral estão entre as principais causas de incapacitação em idosos. A Alzheimer caracteriza-se pelo acúmulo das proteínas β -amilóide e tau em suas formas alteradas, degeneração de neurônios colinérgicos (principalmente do hipocampo e córtex frontal) e déficit cognitivo progressivo (Vickers et al., 2000; Monczor, 2005), enquanto na doença de Parkinson há perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars-compacta e acúmulos de α -sinucleína sob a forma dos corpos de Lewis (Lees et al, 2009). Embora comuns, a causa destas patologias na maioria das vezes é incerta e mecanismos celulares e moleculares relacionados com o desenvolvimento destas doenças são amplamente pesquisados.

A grande maioria dos fármacos hoje empregados para pacientes com a doença de Alzheimer atuam inibindo a acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina, para compensar o déficit deste neurotransmissor (Monczor, 2005; DEF 2010/2011). No caso da doença de Parkinson, entre as principais estratégias abordadas estão o uso do precursor L-DOPA e uso de agentes inibidores da MAO-B, preferencialmente envolvida com a degradação da dopamina, e inibidores da COMT. Uma outra abordagem medicamentosa, e que estaria mais relacionada com uma ação preventiva ou profilática tanto na doença de Alzheimer como na doença de Parkinson, seria o uso de agentes antioxidantes ou sequestradores de radicais livres, numa tentativa de diminuir a morte neuronal induzida por estresse oxidativo, muito comum nas doenças neurodegenerativas (Monczor, 2005).

O envolvimento de mecanismos inflamatórios e o uso de agentes antiinflamatórios no tratamento e prevenção de processos neurodegenerativos também tem sido bastante investigado. Evidências apontam para a importância dos chamados elementos chave da resposta inflamatória, como os metabólitos da prostaglandina, nos processos neurodegenerativos e nos danos causados por quadros de isquemia e crise hemorrágica cerebral (Doré et al., 2003; Glushakov et al., 2013). Neste sentido, uma abordagem que ganha força é a procura por agentes farmacológicos capazes de modular a cascata inflamatória, limitando o processo inflamatório, reestabelecendo o fluxo cerebral normal, limitando a morte neuronal aguda e restaurando as funções celulares normais (Doré, 2006; Leonardo et al., 2013).

Sabe-se da importância das enzimas antioxidantes na manutenção da homeostase, como neutralizadoras das espécies ativas de oxigênio. O aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) está associado com diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (Di Matteo & Esposito, 2003; Choi et al, 2004). Na doença de Parkinson a auto-oxidação da dopamina, e, principalmente sua oxidação enzimática, produzem grande quantidade de ERO, e sua inativação, predominantemente dependente da glutathione peroxidase, é

deficitária. Baseado neste contexto, o uso de antioxidantes foi proposto como estratégia terapêutica para o tratamento de certas doenças neurodegenerativas. Esta abordagem pode ser dividida em duas categorias: uso de vitaminas antioxidantes (vitamina E e análogos, vitamina C) e uso de compostos “não-vitamínicos”, notadamente flavonoides e catequinas, além de outros compostos provenientes de plantas, dotados de potente ação antioxidante (Migliore et al, 2005).

No que se refere à inibição da enzima acetilcolinesterase a literatura é repleta de exemplos de extratos de plantas e princípios ativos com esta atividade, em especial os alcaloides (Mukherjee et al., 2007). Substâncias de origem vegetal, como os alcaloides galantamina e a huperzina A, inibidoras da acetilcolinesterase, vem sendo empregadas clinicamente em idosos com demenciação e pacientes com doença de Alzheimer (Zangara, 2003; Takada-Takori et al., 2006). Ainda hoje, o uso de fármacos inibidores da acetilcolinesterase é a principal estratégia terapêutica utilizada para amenizar a progressão da doença de Alzheimer. De maneira similar, alguns estudos indicam o papel neuroprotetor de plantas e princípios ativos em modelos experimentais da doença de Parkinson (Kim et al., 2004; Chaturvedi et al., 2006; Prediger et al., 2008; Costa et al, 2010). A cafeína, um alcaloide presente no café, no guaraná e no mate, é um antagonista de receptores adenosinérgicos, modulando indiretamente o sistema dopaminérgico, alvo principal de drogas para o tratamento da doença de Parkinson. Estudos experimentais mostraram efeito neuroprotetor da cafeína e do ácido clorogênico em modelos da doença de Parkinson e da doença de Alzheimer (Bové et al, 2005; Aguiar et al, 2006; Arendash et al, 2009; Tsai et al, 2011).

A cultura popular brasileira é extremamente rica em exemplos de plantas utilizadas popularmente para a manutenção da saúde e para amenizar os déficits decorrentes do envelhecimento, entre eles o declínio cognitivo, portanto que se enquadram bem no conceito de adaptógenos (Mendes & Carlini, 2007; Mendes, 2011). São exemplos bem conhecidos o guaraná (*Paullinia cupana*), muirapuama (*Ptychopetalum olacoides*), nó-de-cachorro (*Heteropterys aphrodisiaca*), catuaba (*Trichilia catigua*), a fáfia (*Pfaffia glomerata*), a damiana (*Turnera diffusa*), entre outras. Várias destas espécies já foram alvos de algum tipo de estudo farmacológico que corrobora com seu possível efeito benéfico sobre a memória (Galvão et al., 2002; da Silva et al., 2004; Siqueira et al., 2004; Kennedy et al., 2004; 2008).

Diante desse panorama, surge um campo promissor, tanto no que se refere à pesquisa de novas drogas para o tratamento das moléstias ligadas ao envelhecimento, como para substâncias que atenuem seus processos degenerativos, as quais podemos chamar de neuroprotetoras, muito embora esta terminologia seja questionável. Assim, a investigação de drogas alternativas, originadas de nossa flora, tem importância, tanto clínica como econômica, podendo, além disso, revelar novas estruturas químicas, úteis ao desenvolvimento de drogas sintéticas.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto será avaliar o potencial neuroprotetor de alguns extratos de plantas medicinais e princípios ativos. Este objetivo geral se desdobra em diferentes metas, que incluem desde a avaliação inicial de diversas amostras vegetais (triagem) quanto ao potencial neuroprotetor e posteriormente avaliação daquelas com melhor resultado em estudos sobre os possíveis mecanismos de ação. Desde que é impossível de antemão prever se as amostras (e quais amostras) apresentarão o efeito desejado, os testes para avaliar os possíveis mecanismos neuroprotetores, caso existentes, só poderão ser definidos posteriormente.

Serão provavelmente utilizados no estudo as seguintes plantas ou princípios ativos (a ser definido futuramente junto ao supervisor de pós-doutorado):

- Sementes de Guaraná – *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae);
- Folhas de Mate – *Ilex paraguariensis* (Aquafoliaceae);
- Cascas de Muirapuama – *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae);
- Cascas de Catuaba – *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex de Souza (Bignoniaceae);
- Raízes de Nó-de-cachorro – *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach (Malpigiaceae);
- Cafeína, ácido clorogênico e fração rica em polifenóis

METODOLOGIA

Os métodos que serão utilizados neste projeto de pesquisa ainda estão sendo definidos juntamente com o supervisor do pós-doutorado. Há uma grande variedade de ensaios que possibilitam avaliar o potencial neuroprotetor de fármacos, avaliando seus aspectos antioxidante, anti-inflamatório, ação inibitória sobre enzimas chave, proteção em culturas de células, entre outros. Assim, os métodos mostrados a seguir são possíveis ensaios passíveis de serem realizados e serão descritos apenas brevemente. É importante ressaltar que nesta etapa de solicitação não é necessário ter o projeto de pesquisa pronto, mas sim um plano de trabalho a ser desenvolvido durante o estágio no exterior.

Avaliação da lipoperoxidação em homogenato de cérebro de rato

A atividade antioxidante será avaliada neste modelo pela medida da inibição da lipoperoxidação espontânea de homogenatos de cérebros de ratos na presença de diferentes concentrações das amostras a serem investigadas. Um dos produtos de lipoperoxidação espontânea, e que será medido no ensaio, é o malonodialdeído (MDA), o qual será quantificado pela reação com o

ácido tiobarbitúrico, formando um composto colorido cuja intensidade será medida a 535 nm em espectrofotômetro (Stocks et al., 1974). As amostras com ação antioxidante, ao inibir a lipoperoxidação do homogenato de cérebro, diminuirão a produção de MDA, que será detectada espectrofotometricamente.

A capacidade antioxidante será obtida para cada concentração das amostras e a concentração que inibe 50 % da lipoperoxidação (CI₅₀) será calculada através de regressão linear, utilizando o log da concentração na abscissa e a porcentagem de inibição nas ordenadas, de uma média de 3 a 4 ensaios.

Determinação da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase

A determinação da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) será avaliada a partir de cérebro de animais tratados com os extratos e princípios ativos que se mostrarem mais ativos nos estudos de ação antioxidante *in vitro*. Após o período estipulado de tratamento, os animais serão anestesiados, perfundidos com solução salina 0,9% e em seguida os cérebros serão retirados e homogeneizados em tampão fosfato de potássio, para posterior separação enzimática.

Para a determinação da atividade da SOD total, será usado o método da xantina / xantina oxidase e citocromo c, sendo o processo monitorado por espectrofotômetro a 550 nm. A atividade da catalase será determinada pelo método descrito por Beers & Sizer (1952), no qual o desaparecimento do peróxido é observado espectrofotometricamente à 240 nm. A determinação da atividade da GSH-Px será realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH, no comprimento de onda de 340 nm (Wendel, 1981).

Todos os resultados serão normalizados pela concentração de proteínas utilizando o método de Bradford (1976) usando soro de albumina bovina como padrão.

Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase *in vitro*

A atividade e a inibição da enzima acetilcolinesterase serão calculadas pelo método espectrofotométrico descrito por Orhan et al. (2007) e Ozturk et al. (2011). Brevemente, uma mistura em tampão de fosfato (pH 8,0) contendo acetilcolinesterase, iodeto de acetiltiocolina (substrato da colinesterase), reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico - DTNB) e diferentes concentrações de cada amostra será incubada a 37 °C e a formação do ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato será monitorada no comprimento de onda de 412 nm. Trata-se de um método simples e rápido para a triagem de substâncias potencialmente úteis como agentes anticolinesterásicos.

Avaliação da inibição da enzima monoaminoxidase (MAO)

A atividade inibidora *in vitro* da MAO-A e da MAO-B pelos extratos será avaliada segundo o método descrito por Gnerre et al. (2001) e Jesse et al. (2010), com pequenas modificações. Para tanto, serão empregadas preparações de mitocôndria de cérebro de ratos, isoladas e incubadas com as drogas a serem testadas. Os cérebros serão homogeneizados a fração mitocondrial será extraída e quantificada (proteínas totais) pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A avaliação do efeito das amostras será feita incubando diferentes concentrações da mesma em uma solução contendo a fração enzimática com a MAO e o substrato quinuramina, juntamente com drogas inibidoras seletivas das isoformas da MAO: clorgilina (inibidor da MAO-A) e selegilina (inibidor da MAO-B). A atividade enzimática será medida pela formação de 4-hidroxiquinolina em espectrofotômetro à 314 nm.

PLANO DE TRABALHO

O período programado para o desenvolvimento das atividades de pós-doutorado no exterior é de um ano, podendo ser prorrogado por 6 meses, mediante autorização da UFABC e da agência que eventualmente venha a financiar o pós-doc. Conforme conversas prévias com o supervisor no exterior, Prof Sylvain Doré, da Universidade da Flórida, os primeiros meses de estágio serão dedicados a familiarização com o laboratório e treinamento das técnicas a serem utilizadas.

O estudo será conduzido de forma que inicialmente sejam realizados os testes mais simples, e que servirão para o screening (triagem) dos materiais botânicos e princípios ativos objetos do estudo. Em um segundo momento, testes mais sofisticados serão utilizados para avaliar as amostras com resultados mais expressivos, e finalmente, outros testes serão planejados com o uso de agonistas e antagonistas, ou de ferramentas da biologia molecular para tentar elucidar os possíveis mecanismos de ação das substâncias neuroprotetoras.

O Prof Doré se compromete a reunir-se comigo semanalmente para discutir e avaliar o andamento dos estudos e planejar os próximos passos da pesquisa. Este compromisso está assumido na carta de aceite encaminhada por ele.

BIBLIOGRAFIA

- Aguiar LM, Nobre HV Jr, Macêdo DS, Oliveira AA, Freitas RM, Vasconcelos SM, *et al.* - Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** **84**: 415-419, 2006.
- Arendash, G.W., Mori, T., Cao, C., Mamcarz, M., Runfeldt, M., Dickson, A., Rezai-Zadeh, K., Tan, J., Citron, B.A., Lin, X., Echeverria, V., Potter, H. - Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. **Journal of Alzheimers Disease** **17**: 661-680, 2009.
- Beers, R.F.Jr.; Sizer, I.W.- A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry** **195**:133-140, 1952.
- Bové J, Serrats J, Mengod G, Cortés R, Tolosa E, Marin C. - Neuroprotection induced by the adenosine A2A antagonist CSC in the 6-OHDA rat model of parkinsonism: effect on the activity of striatal output pathways. **Experimental Brain Research** **165**: 362-374, 2005.
- Bradford, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254, 1976.
- Chaturvedi RK, Shukla S, Seth K, Chauhan S, Sinha C, Shukla Y, et al. Neuroprotective and neurorescue effect of black tea extract in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease** **22**: 421-432, 2006.
- Choi, J., Levey, A.I., Weintraub, S.T., Rees, H.D., Gearing, M., Chin, L.S., Li, L. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. **Journal of Biological Chemistry** **279**: 13256-13264, 2004.
- Costa J, Lunet N, Santos C, Santos J, Vaz-Carneiro A. - Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of Alzheimers Disease Suppl** **1**: S221-238, 2010.
- da Silva, A.L.; Piato, A.L.S.; Bardini, S.; Netto, C.A.; Nunes, D.S.; Elisabetsky, E. - Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. **Journal of Ethnopharmacol** **95**: 199-203, 2004.
- DEF 2010/2011. **Dicionário de especialidades farmacêuticas**. 39^a ed. Editora de Publicações Científicas Ltda., 2011.
- Di Matteo, V.; Esposito, E. - Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. **Current Drug Targets CNS Neurological Disorders** **2**: 95-107, 2003.
- Doré, S. – GPCR antagonists as an alternative to COX-2 inhibitors: a case for the PGE₂ EP1 receptor. **Trends in Pharmacological Science** **27**: 458-460, 2006.
- Doré, S.; Otsuka, T.; Mito, T.; Sugo, N.; Hand, T.; Wu, L.; Hurn, P.D.; Traystman, R.J.; Andreasson, K. – Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. **Annual Neurology** **54**: 155-162, 2003.
- Galvão, S.M.P.; Marques, L.C.; Oliveira, M.G.M.; Carlini, E.A. - *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. **Journal of Ethnopharmacology** **79**: 305-311, 2002.
- Glushakov, A.V.; Robbins, S.W.; Bracy, C.L.; Narumiya, S.; Doré, S. – Prostaglandin F2 α FP receptor antagonist improves outcome after experimental traumatic brain injury. **Journal of Neuroinflammation** **10**: 132, 2013.

- Gnerre C, von Poser GL, Ferraz A, Viana A, Testa B, Rates SMK. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** **53**: 1273-1279, 2001.
- Jesse, C.R.; Wihelm, E.A.; Bortolatto, C.F.; Nogueira, C.W. - Evidence for the involvement of the noradrenergic system, dopaminergic and imidazoline receptors in the antidepressant-like effect of tramadol in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior** **95**: 344-350, 2010.
- Kennedy, D.O.; Haskell, C.F.; Robertson, B.; Reay, J.; Brewster-Maund, C.; Luedemann, J. et al. - Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guarana (*Paullinia cupana*). **Appetite** **50**: 506-513, 2008.
- Kennedy, D.O.; Haskell, C.F.; Wesnes, K.A.; Scholey, A.B. - Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** **79**: 401-411, 2004.
- Kim MS, Lee JI, Lee WY, Kim SE. Neuroprotective effect of *Gingko biloba* L. in a rat model of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research** **18**: 663-666, 2004.
- Lees, A.J., Hardy, J., Revesz, T. Parkinson's disease. **The Lancet** **373**: 2055-2066, 2009.
- Leonardo, C.C; Agrawal, M.; Singh, N.; Moore, J.R.; Biswal, S.; Doré, S. - Oral administration of the flavanol (-) epicatechin bolsters endogenous protection against focal ischemia through the Nrf2 cytoprotective pathway. **European Journal of Neuroscience** 2013 (PMID: 24112193).
- Mendes, F.R. - Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **21**: 754-763, 2011.
- Mendes, F.R.; Carlini, E.A. - Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil **Journal of Ethnopharmacology** **109**: 493-500, 2007.
- Migliore, L., Fontana, I., Colognato, R., Coppede, F., Siciliano, G., Murri, L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Aging** **26**: 587-595, 2005.
- Monczor, M. - Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. **Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents** **5**: 5-13, 2005.
- Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P.J. - Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine** **14**: 289-300, 2007.
- Orhan, I.; Kartal, M.; Tosun, F.; Sener, B. - Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A / Journal of Bioscience** **62**: 829-832, 2007.
- Ozturk, M.; Kolak, U.; Topcu, G.; Oksuz, S.; Choudhary, M.I. - Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. **Food Chemistry** **126**: 31-38, 2011.
- Prediger RDS, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology** **120**: 465-473, 2008.
- Siqueira, I.R.; Cimarosti, H.; Fochesatto, C.; Nunes, D.S.; Salbego, C.; Elisabetsky, E.; Netto, C.A. - Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. **Life Sciences** **75**: 1897-1906, 2004.

- Stocks, J.; Gutteridge, M.C.; Sharp, R.J.; Dormandy, T.L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clinical and Science Molecular Medicine** **47**: 215-222, 1974.
- Takada-Takori, Y.; Kume, T.; Sugimoto, M.; Hatsuki, H.; Niidome, T.; Sugimoto, H.; Fujii, T.; Okabe, S.; Akaibe, A. – Neuroprotective effects of galanthamine and tacrine against glutamate neurotoxicity. **European Journal of Pharmacology** **549**: 19-26, 2006.
- Tsai SJ, Chao CY, Yin MC. - Preventive and therapeutic effects of caffeic acid against inflammatory injury in striatum of MPTP-treated mice. **European Journal of Pharmacology** **670**: 441-447, 2011.
- Vickers, J.C.; Dickson, T.C.; Adlard, P.A.; Saunders, H.L.; King, C.E.; McCormack, G. - The cause of neural degeneration in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology** **60**: 139-165, 2000.
- Wendel, A. - Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology** **77**: 325-333, 1981.
- Zangara, A. – The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** **75**: 675-686, 2003.