

ESTRATÉGIAS DE NEUROPROTECÇÃO

Efeito da Vimpocetina em Modelos *in vitro* de Stresse Oxidativo*

CLÁUDIA PEREIRA, PAULA AGOSTINHO, PAULA I. MOREIRA, ANA I. DUARTE,
MARIA S. SANTOS, CATARINA R. OLIVEIRA

Departamento de Zoologia e Centro de Neurociências. Faculdade de Medicina. Universidade de Coimbra. Coimbra.

RESUMO/SUMMARY

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) desempenham um papel importante na lesão e morte dos neurónios que ocorre em várias doenças neurodegenerativas, nomeadamente na doença de Alzheimer (DA). O facto da neutralização das ROS poder atrasar ou minimizar o processo de degenerescência neuronal estimula o desenvolvimento de novos fármacos, mais eficientes e melhor tolerados, com propriedades antioxidantes. A vimpocetina [14-etoxicarbonil-3 α ,16 α -etil)-14,15-eburnamina], um derivado alcalóide da vincamina, protege eficazmente as células do ataque das ROS. Recentemente, o seu efeito protector foi demonstrado utilizando modelos *in vitro* de stresse oxidativo induzido, respectivamente, pelo par oxidante ascorbato/Fe²⁺ e por fragmentos sintéticos da proteína β -amilóide (A β), associada à DA. Os resultados obtidos até ao momento, em experiências *in vitro*, justificam a realização de ensaios clínicos adicionais usando a vimpocetina, ou derivados desta, com vista a testar a sua eventual eficácia terapêutica ou preventiva em doenças em que o stresse oxidativo desempenha um papel crucial.

Palavras-chave: *vimpocetina, Doença de Alzheimer, stresse oxidativo, beta-amilóide*

NEUROPROTECTION STRATEGIES: EFFECT OF VINPOCETINE IN *IN VITRO* OXIDATIVE STRESS MODELS

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in neuronal damage and death that occurs in several neurodegenerative disorders, namely in Alzheimer's disease (AD). The observation that ROS neutralization may slow or reduce the neurodegenerative process associated with those pathologies stimulates the development of new drugs, more efficient and well tolerated, with antioxidant properties. Vinpocetine [14-etoxicarbonyl-3 α ,16 α -ethyl)-14,15-eburnamine], a vincamine derivative, efficiently protects cells from ROS attack. Recently, the protective effect of vimpocetine was demonstrated using *in vitro* models of oxidative stress induced by the oxidant pair ascorbate/Fe²⁺ and by synthetic peptides of the AD-associated b-amyloid protein (A β). Results obtained from these *in vitro* experiences support that additional clinical trials should be carried out using vimpocetine, or vimpocetine derivatives, in order to test its therapeutical or preventive effects in diseases where oxidative stress plays a crucial role.

Key words: *vinpocetine, Alzheimer's disease, oxidative stress, beta-amyloid*

* aaEste trabalho tem o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia, (FCT)

INTRODUÇÃO

O aumento dos níveis de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na célula, formadas permanentemente durante a redução do oxigénio molecular em água, resulta do desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes celulares, designando-se por stresse oxidativo¹. Este promove a degenerescência celular em consequência dos efeitos citotóxicos das ROS, tais como o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), capazes de atacar componentes celulares incluindo ácidos nucleicos, proteínas e fosfolípidos membranares^{1,2}. Devido aos seus efeitos potencialmente lesivos, e sendo os neurónios particularmente susceptíveis ao ataque por espécies radiculares, as ROS e os processos oxidativos em que estas estão envolvidas, têm sido associados a várias lesões neuronais, que se observam, por exemplo, na isquémia cerebral, na esclerose lateral amiotrófica e na doença de Parkinson³⁻⁵. Uma vez que, segundo a teoria dos radicais livres no envelhecimento, a lesão oxidativa é a causa principal da degenerescência das células⁶ e sendo o envelhecimento o principal factor de risco da maioria dos casos de doença de Alzheimer (DA), foi sugerido que o stresse oxidativo também desempenha um papel importante na patogenia e na progressão desta doença⁷. Vários estudos forneceram evidências de que a proteína beta-amiloide ($\text{A}\beta$), cuja acumulação extracelular anormal constitui uma das principais características neuropatológicas da DA⁸, pode induzir stresse oxidativo e peroxidação lipídica através da indução da acumulação de H_2O_2 ⁹.

A elucidação das vias intracelulares envolvidas na formação de ROS em neurónios poderá ser importante não só para a compreensão das bases patofisiológicas da morte neuronal nestas doenças mas também para o desenvolvimento racional de estratégias farmacológicas que visem retardar ou prevenir a degenerescência neuronal. No que diz respeito à DA, a administração repetida dos antioxidantes idebenona e α -tocoferol previne os defeitos de memória e aprendizagem em ratos tratados com $\text{A}\beta_{1-42}$, a forma mais neurotóxica e amiloidogénica da proteína $\text{A}\beta$ ¹⁰, resultados que certificam os ensaios clínicos com antioxidantes no tratamento deste tipo de patologia. Um primeiro ensaio clínico usando o antioxidante α -tocoferol e/ou a selegilina (L-deprenil) foi completado recentemente com sucesso, tendo-se demonstrado que em doentes de Alzheimer estes compostos reduzem eficientemente a progressão da doença, atrasando a data de institucionalização, a perda de actividades de rotina diária, a progressão para uma fase mais grave da doença ou a morte¹¹. Um estudo mais recente em que foi avaliado se o uso de vitamina E e C protegia do desenvolvimento subsequente

de demência e do déficite cognitivo mostrou que as vitaminas E e C não têm efeito protector na DA¹².

EFEITO NEUROPROTECTOR/ANTIOXIDANTE DA VIMPOCETINA

A vimpocetina (etil-apovincamina-22-oato), é um derivado sintético do alcalóide vincamina (*Figura 1.*) que foi originalmente descrito como sendo um vasodilatador cerebral¹³. Este fármaco possui um efeito neuroprotector em vários modelos experimentais, reduzindo a lesão neuronal que ocorre em condições de hipóxia ou isquémia¹³⁻¹⁸. Durante isquémia aguda e reperfusão, a vimpocetina mostrou ter um efeito benéfico na circulação cerebral e na função celular¹⁵. Este composto decresce a resistência vascular a nível cerebral, a viscosidade do sangue, a agregação plaquetar e aumenta a fluidez dos glóbulos vermelhos sanguíneos¹⁹. Além disso, a vimpocetina apresenta efeitos protectores em relação à morte celular induzida por várias excitotoxinas²⁰ e inibe a citotoxicidade do glutamato em neurónios cerebrocorticais²¹. Finalmente, várias evidências mostram que a vimpocetina possui propriedades anticonvulsivas importantes²².

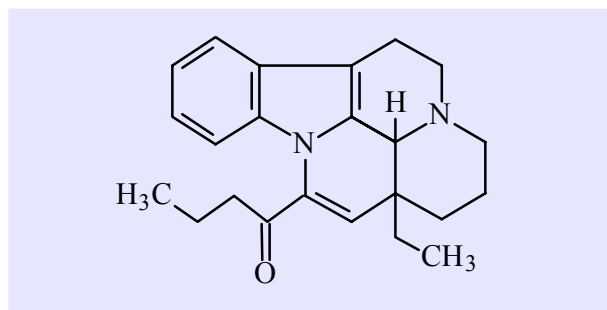


Fig. 1 Estrutura química da vimpocetina

Têm sido feitos numerosos esforços no sentido de identificar o alvo molecular responsável pelos efeitos da vimpocetina acima mencionados. Foram obtidas evidências de que a sua acção protectora está relacionada com a inibição de canais de Na^+ dependentes da voltagem^{23,24} e com a inibição indirecta de processos moleculares iniciados pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular²⁵. Além disso, demonstrou-se que a vimpocetina atenua a resposta ao NMDA em oócitos, reduz a ligação do AMPA a membranas corticais, inibe a libertação de acetilcolina estimulada por aminoácidos excitatórios, e protege os neurónios cerebrocorticais da excitotoxicidade^{20,26,27}. Foi também referida na literatura a potenciação da neuroprotecção *in vitro* mediada pela adenosina²⁸. Finalmente, mostrou-se que a vimpocetina é um inibidor selec-

tivo de cGMP-fosfodiesterases dependentes de Ca^{2+} -calmodulina. Apesar do mecanismo de acção neuroprotectora da vimpocetina não estar completamente esclarecido, foram já demonstradas as suas características antioxidantes, em especial a sua capacidade de neutralização do radical $\cdot\text{OH}$ ^{21,29,30}. Além disso, foi provada a inibição da produção de peróxidos lipídicos em homogeneizados de cérebro pelo VA-045, um derivado do ácido apovincamínico³¹. Mais recentemente, demonstrámos que a vimpocetina actua como um antioxidante tendo um efeito protector em dois modelos de stresse oxidativo induzido, respectivamente, por ascorbato/ Fe^{2+} ,³² e pela proteína beta amilóide ($\text{A}\beta$)³³.

A VIMPOCETINA PROTEGE DO STRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO PAR ASCORBATO/ Fe^{2+}

No nosso laboratório foi avaliado em terminais nervosos isolados (sinaptossomas) o papel protector da vimpocetina relativamente ao stresse oxidativo induzido pelo par oxidante ascorbato/ Fe^{2+} , um agente peroxidativo membranar eficaz que é activo na formação de radicais livres^{34,35}. Os resultados obtidos demonstram claramente que a vimpocetina é bastante eficiente a prevenir a lesão induzida por ascorbato/ Fe^{2+} em sinaptossomas inibindo a formação de ROS e a peroxidação lipídica³².

Pensa-se que o par ascorbato/ Fe^{2+} induz peroxidação lipídica em sinaptossomas estimulando a formação de ROS através da reacção de Haber-Weiss catalisada pelo ferro^{36,37}. Estas espécies são altamente reactivas e podem iniciar reacções em cadeia, tais como a peroxidação lipídica capaz de alterar a estrutura, função e permeabilidade das membranas, resultando finalmente na morte celular. A vimpocetina demonstrou ser tão eficiente a prevenir o stresse oxidativo induzido pelo ascorbato/ Fe^{2+} quanto o Trolox, um análogo do α -tocoferol (derivado da vitamina E), solúvel em água. A vitamina E é um dos sistemas antioxidantes lipofílicos mais importantes que actua como um agente capaz de impedir a propagação da cadeia da peroxidação lipídica neutralizando radicais peróxido e alcóxido mem-branares³⁸. A vitamina E protege eficazmente a lesão em condições de stresse oxidativo induzido por ascorbato/ Fe^{2+} , decrescendo a peroxidação lipídica em vários modelos neuronais incluindo células da retina^{39,40} e sinaptossomas^{35,41}.

O efeito neuroprotector da vimpocetina pode também resultar da prevenção da redução do gradiente electroquímico de Na^+ e da libertação dos aminoácidos excitatórios aspartato e glutamato que ocorre em condições de stresse oxidativo. Estudos prévios no nosso laboratório mostraram que condições de stresse oxidativo aumentam a

concentração intracelular de Na^+ em repouso em células da retina, em consequência da activação de receptores do glutamato⁴². A vimpocetina, através do bloqueio de canais de Na^+ pode prevenir a lesão neuronal excitotóxica⁴³. De facto, experiências em sinaptossomas mostraram que a vimpocetina reduz o aumento da $[\text{Na}^+]_i$ induzido por veratridina através da inibição de canais de Na^+ dependentes da voltagem²⁴. Resultados semelhantes foram descritos em neurónios cerebrocorticais em cultura⁴⁴.

In vivo, o efeito clínico da vimpocetina pode em parte ser devido à redução do stresse oxidativo causado pela elevada concentração extracelular de glutamato em consequência da isquémia e/ou hipóxia cerebrais. Números estudos realizados na última década demonstraram que são formadas ROS após lesão do sistema nervoso central e que essa formação pode ser iniciada por níveis excitotóxicos de glutamato extracelular⁴⁵⁻⁴⁷. Foi também demonstrado que a vimpocetina inibe a libertação de acetilcolina e dopamina após estimulação de receptores para o glutamato^{26,27} e que protege as células neuronais da toxicidade do glutamato de um modo dependente da dose²¹. A eficácia de vários antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica correlaciona-se com a sua acção protectora em relação à citotoxicidade induzida pelo glutamato^{21,48}. Recentemente, foi demonstrado que parte da acção da vimpocetina está relacionada com o aumento do efeito protector da adenosina²⁸. A adenosina é um agente endógeno protector da excitotoxicidade induzida por hipóxia/isquémia ou hipoglicémia através do decréscimo da libertação de glutamato⁴⁹.

A VIMPOCETINA ATENUA A TOXICIDADE INDUZIDA PELA PROTEÍNA BETA-AMILÓIDE ($\text{A}\beta$)

Tendo-se observado que processos mediados pelo stresse oxidativo poderão estar envolvidos em doenças neurodegenerativas, tais como a DA, vários antioxidantes têm sido propostos e usados como potenciais agentes terapêuticos contra a morte neuronal induzida por stresse oxidativo^{11,50-52}. Vários estudos forneceram evidências de que a proteína $\text{A}\beta$, cuja acumulação extracelular anormal constitui uma das principais características neuropatológicas da DA⁸, pode induzir stresse oxidativo e peroxidação lipídica através da indução da acumulação de H_2O_2 ⁹. Resultados obtidos no nosso grupo de investigação demonstram que a proteína $\text{A}\beta$ inibe o metabolismo energético das células PC12 por um mecanismo que envolve a formação de ROS^{53,54}. Posteriormente, foi analisado o efeito antioxidante da vimpocetina na toxicidade induzida por dois fragmentos sintéticos da proteína $\text{A}\beta$, na mesma linha celular PC12 que constitui um modelo válido para in-

investigar a morte neuronal e os mecanismos de neuroprotecção. Os dados mostram claramente que a vimpocetina atenua a toxicidade induzida pelos peptídeos sintéticos da A β nas células PC12, mantendo a capacidade redutora celular, protegendo da acumulação de ROS e da inibição da actividade glicolítica e mitocondrial⁵³⁻⁵⁴.

A actividade protectora da vimpocetina em relação à toxicidade induzida pelos peptídeos da A β parece resultar da sua capacidade de neutralizar radicais livres, uma vez que foi prevenida a acumulação intracelular de peróxidos. Os resultados obtidos apoiam trabalhos prévios que demonstram a actividade antioxidante da vimpocetina^{21,30}. Além disso, foi demonstrada a sua capacidade em neutralizar radicais \cdot OH e inibir a peroxidação lipídica^{29,30,48}. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos em sinaptossomas em que se mostrou que a vimpocetina possui características antioxidantes, inibindo a formação de ROS e a peroxidação lipídica estimuladas por ascorbato/ Fe^{2+} ³². Por outro lado, foi previamente demonstrado que fragmentos da proteína A β induzem a formação de ROS e que a sua toxicidade é prevenida por vários antioxidantes^{9,50,51,56-58}, sugerindo que o stresse oxidativo está envolvido na toxicidade desta proteína. Este estudo demonstrou que os peptídeos da A β conduzem ao aumento da acumulação de ROS, aumento esse que se correlaciona com o decréscimo da sobrevivência das células, e que é prevenido por vários antioxidantes⁵⁵.

A vimpocetina previne a depleção dos níveis de piruvato e a inibição dos Complexos II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial induzidas pelos peptídeos sintéticos A β_{25-35} ou A β_{1-40} , o que demonstra a sua acção protectora em relação à inibição glicolítica e da função mitocondrial celular. Este efeito protector da vimpocetina também é consistente com a sua actividade antioxidante uma vez que havia sido demonstrado previamente que os antioxidantes vitamina E, idebenona e GSH previnem a depleção do conteúdo intracelular em piruvato e a inibição dos complexos mitocondriais induzida pelos peptídeos A β_{25-35} ou A β_{1-40} ⁵³. No entanto, o efeito protector da vimpocetina acima referido poderá também estar relacionado com o aumento da tomada de glicose, estimulando-se deste modo a actividade glicolítica e mitocondrial das células. De facto, foi demonstrado que a tomada e utilização cerebral de glicose são estimuladas por este composto^{18,59}.

A acção protectora da vimpocetina poderá ainda estar relacionada com a redução do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ resultante do influxo de Ca^{2+} através de canais de cálcio sensíveis à voltagem (CCSV)^{20,24}. Foi sugerido que a proteína A β exerce os seus efeitos neurotóxicos porque gera radi-

cais livres que potenciam o influxo de Ca^{2+} através de CCSV do tipo L^{60,61}, resultando no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e no colapso da homeostase do Ca^{2+} ⁶²⁻⁶⁴. Assim, o efeito protector deste composto poderá estar associado não só à neutralização de radicais livres mas também à inibição do influxo de Ca^{2+} através de CCSV, e consequente aumento da $[Ca^{2+}]_i$. De facto, foi demonstrado que em células PC12, a proteína A β estimula a tomada de Ca^{2+} e aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ ^{65,66}.

A importância clínica da neuroprotecção exercida por antioxidantes foi sugerida por Sano et al¹¹ ao mostrarem que o tratamento de doentes de Alzheimer com vitamina E retarda a progressão da doença, apesar de num estudo mais recente a vitamina E não ter apresentado qualquer efeito protector¹². No entanto, apesar destes dados aparentemente contraditórios, o tratamento com antioxidantes constitui uma estratégia promissora para retardar a progressão deste tipo de demência uma vez que a lesão oxidativa está presente no cérebro de doentes de Alzheimer. Os nossos resultados mostram o potencial antioxidante da vimpocetina num modelo de stresse oxidativo associado à DA, usando culturas de células neuronais. No entanto, um estudo efectuado por Thal et al⁶⁷ com um grupo de doentes de Alzheimer, mostrou que a vimpocetina é incapaz de melhorar os defeitos cognitivos e não retarda a progressão da demência. A utilização de novos derivados do ácido apovincamínico, como o VA-045, com estrutura e actividade biológica semelhantes à da vimpocetina e possuindo eficiência superior⁶⁸, poderá ser mais proveitosa no tratamento da DA.

CONCLUSÕES

Em conclusão, a vimpocetina pode ser considerada um antioxidante capaz de reduzir a formação de ROS e a peroxidação lipídica, protegendo as membranas celulares do ataque dos radicais livres, o que está de acordo com os dados clínicos que mostram que a vimpocetina é um fármaco útil no tratamento de várias doenças cerebrovasculares nas quais a produção de ROS e a peroxidação lipídica ocorrem em elevada extensão. Os resultados obtidos recentemente no nosso grupo, ao indicarem que a vimpocetina pode funcionar como um antioxidante protegendo do stresse oxidativo induzido por ascorbato-ferro, em sinaptossomas, e pela proteína A β , em células PC12, estimula a investigação da sua potencial aplicação no tratamento da neurodegenerescência associada a doenças como a doença de Alzheimer, a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Parkinson em cuja patogenia e progressão o stresse oxidativo está envolvido.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: à Tecnimed a generosa oferta da vimpocetina; a Teresa Dinis (Centro de Neurociências, Faculdade de Farmácia de Coimbra) pelo estabelecimento das condições experimentais para determinação da ligação do ferro pela vimpocetina e pela discussão do trabalho; a Teresa Proença (Laboratório de Neuroquímica, Hospital da Universidade de Coimbra) pela ajuda na medição dos níveis endógenos de piruvato. As co-autoras do trabalho Ana Duarte e Paula Moreira são bolsistas da FCT.

BIBLIOGRAFIA

- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1989; 2nd edn. Oxford University Press, Oxford
- GUTTERIDGE JM: Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:201-213
- CLEMENS JA, PANETTA JA: Neuroprotection by antioxidants in models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:250- 256
- EBADI M, SRINIVASAN SK, BAXI MD: Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 1996; 48:1-19
- ROBBERECHT W, BOSH LVD: The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Res Commun* 1998; 23:67-75
- HARMAN D, EDDY DE, NOFFSINGER J: Free radical theory of aging: inhibition of amyloidosis in mice by antioxidants; possible mechanism. *J Am Geriatr Soc* 1976; 24:203-210
- HARMAN D: Free radical theory of aging: Alzheimer's disease pathogenesis. *Age* 1995; 18:97-119
- SELKOE DJ: The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1993; 6:487-498
- BEHL C, DAVIS JB, LESLY R, SCHUBERT D: Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 1994; 77:817-827
- YAMADA K, TANAKA T, HAN D, SENZAKI K, KAMEYAMA T, NABESHIMA T: Protective effects of idebenone and α -tocopherol on β -amyloid-(1-42) induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* 1999; 11:83-90
- SANO M, ERNESTO C, THOMAS RG, KLAUBER MR, SCHAFER K, GRUNDMAN M, WOODBURY P, GROWDON J, COTMAN DW, PFEIFFER E, SCHNEIDER LS, THAL LJ: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimers disease. *N Engl J Med* 1997; 336:1216-1222
- MASAKI KH, LOSONCZY KG, IZMIRLIAN G, FOLEY DJ, ROSS GW, PETROVITCH H, HAVLIK R, WHITE LR: Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology* 2000; 54:1265-1272
- KÁRPÁTI E, SZPORNÝ L: General and cerebral haemodynamic activity of ethyl apovincaminat. *Arzneimittelforsch* 1976; 26:1908-1912
- OTOMO E, ATARASHI J, ARAKI G, ITO E, OMAL T, KUZUYA F, NUKADA T, EBI O: Comparison of vinpocetine with ifenprodil and dihydroergotoxine mesylate treatment and results of long treatment with vinpocetine. *Curr Ther Res* 1985; 37:811-821
- KING GA: Protective effects of vinpocetine and structurally related drugs on the lethal consequences of hypoxia in mice. *Arch Int Pharmacodyn* 1987; 286:299-307
- SAUER D, RISCHKE R, BECK T, ROSSBERG C, MENNEL HD, BIELENBERG GW, KRIEGLSTEIN J: Vinpocetine prevents ischemic cell damage in rat hippocampus. *Life Sci* 1988; 43:1733-1739
- ARAKI T, KOGURE K, NISHIAKA K: Comparative neuroprotective effect of pentobarbital, vinpocetine, flunarizine and ifenprodil on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Res Exp Med* 1990; 190:19-23
- RISCHKE R., KRIEGLSTEIN J: Effects of vinpocetine on local cerebral blood flow and glucose utilization seven days after forebrain ischemia in the rat. *Pharmacology* 1990; 41:153-160
- KISS B, KÁRPÁTI E: Mechanism of action of vinpocetine. *Acta Pharm Hung* 1996; 66:213-224
- ERDŐ SL, NING-SHENG C, WOLFF JR, KISS B: Vinpocetin protects against excitotoxic cell death in primary cultures of rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* 1990; 187:551-553
- MIYAMOTO M, MURPHY TH, SCHNAAR RL, COYLE JT: Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250:1132-1140
- SCHMIDT J: Comparative studies on the anticonvulsant effectiveness of nootropic drugs in kindled rats. *Biomed Biochim Acta* 1990; 49:413-419
- LAKICS V, SEBESTYÉN MG, ERDŐ SL: Vinpocetine is a highly potent neuroprotectant against veratridine-induced cell death in primary cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1995; 185:127-130
- TRETTNER L, ADAM-VIZI V: The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine-induced $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ rise in synaptosomes. *NeuroReport* 1998; 9:1849-1853
- KANEKO S, TAKAHASHI H, SATOH M: The use of *Xenopus* oocytes to evaluate drugs affecting brain Ca^{2+} channels: effects of bifemelane and several nootropic agents. *Eur J Pharmacol* 1990; 189:51-58
- KANEKO S, SUGIMURA M, INOUE T, SATOH M: Effects of several cerebroprotective drugs on NMDA channel function: evaluation using *Xenopus* oocytes and $[^3H]MK-801$ binding. *Eur J Pharmacol* 1991; 207:119-128
- KISS B, CAI NS, ERDŐ SL: Vinpocetine preferentially antagonises quisqualate/AMPA receptor responses: evidence from release and ligand binding studies. *Eur J Pharmacol* 1991; 209:109-112
- KRIEGLSTEIN J, RISCHKE R: Vinpocetine increases the neuroprotective effect of adenosine in vitro. *Eur J Pharmacol* 1991; 205:7-10
- OLÁH VA, BALLA G, BALLA J, SZABOLCS A, KARMAZSIN L: An in vitro study of the hydroxyl scavenger effect of Cavinton. *Acta Paediatr Hung* 1990; 30:309-316
- ORVISKÝ E, SOLTES L, STANCIKOVA M: High-molecular-weight hyaluronan- a valuable tool in testing the antioxidative activity of amphiphilic drugs stobadine and vinpocetine. *Pharm Biomed Anal* 1997; 16:419-424
- TSUYUKI UY, OKUYAMA S, ARAKI H: VA-045, a novel apovincamic acid derivative attenuates neuronal injury induced by hypoxia or by excitatory amino acids in cultures of rat cortices. *Life Sci* 1996; 59:1571-1578

32. SANTOS MS, DUARTE AI, MOREIRA PI, OLIVEIRA CR: Synaptosomal response to oxidative stress: effect of vinpocetine. *Free Rad Res* 2000; 32:57-66
33. PEREIRA C, AGOSTINHO P, OLIVEIRA CR: Vinpocetine attenuates the metabolic dysfunction induced by amyloid β -peptides in PC12 cells. *Free Rad. Res* 2000; 33:497-506
- [34] PALMEIRA CM, SANTOS MS, OLIVEIRA CR: Membrane lipid peroxidation in duces changes in the γ -[3 H]aminobutyric acid transport and Ca^{2+} uptake in synaptosomes. *Brain Res.* 1993; 609:117-123
- [35] CARDOSO SM, PEREIRA C, OLIVEIRA CR: The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:703-710
- [36] HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC: Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci* 1985; 8:22-26
- [37] GUTTERIDGE JMC, HALLIWELL B: The measurements and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; 15:129-135
- [38] WITTING LA: Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical initiated reaction. *Free Radical in Biology*, (W. A. Pryor, Ed.), 1980; pp. 295-319, Academic Press, New York
- [39] AGOSTINHO P, DUARTE CB, OLIVEIRA CR: Impairment of excitatory amino acid transporter activity by oxidative stress conditions in retinal cells: effect of antioxidants. *FASEB J* 1997; 11:154-163
- [40] REGO AC, SANTOS MS, PROENÇA MT, OLIVEIRA CR: Influence of vitamin E on retinal cell survival. *Toxicology* 1998; 128:113-124
- [41] CARDOSO SM, PEREIRA C, OLIVEIRA CR: Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:3-13
- [42] AGOSTINHO P, DUARTE CB, OLIVEIRA CR: Intracellular free Na^+ concentration increases in cultured retinal cells under oxidative stress conditions. *Neurosci Res* 1996; 25:343-351.
- [43] ROMANO C, PRICE MT, OLNEY JW: Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina. *J Neurochem* 1995; 65:59-67
- [44] MOLNÁR P, ERDŐ SL: Vinpocetine is as potent as phenytoin to block voltage-gated Na^+ channels in rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 1995; 273:303-306
- [45] PELLEGRINI-GIAMPINETTO D, CHERICI G, ALESIANI M, CARLA V, MORONI F: Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 1990; 10:1035-1041
- [46] GLOBUS O, ALONSO WD, DIETRICH WD, BUSTO R, GINSBERG MD: Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of post traumatic hypothermia. *J Neurochem* 1995; 65:1704-1711
- [47] LANCELOT E, CALLEBERT J, REVAUD M. L, BOULU RG, PLOTKINE M: Detection of hydroxyl radicals in rat striatum during transient focal cerebral ischemia: possible implication in tissue damage. *Neurosci Lett* 1995; 197:85-88
- [48] SUNO M, NAGAOKA A: Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound (CV-2619) in brain mitochondria and mode of action of inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 125:1046-1052
- [49] RUDOLPHI KA, SCHUBERT P, PARKINSON FE, FREDHOLM BB: Neuroprotective role of adenosine in ischemia. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13:439-445.
- [50] BEHL C, DAVIS J, COLE GM, SCHUBERT D: Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186:944-950
- [51] BEHL C, TRAPP T, SKUTELLA T, HOLSBOER F: Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death: a novel role for RU486. *Eur J Neurosci* 1997a; 9:912-920
- [52] BEHL C, SKUTELLA T, LEZOULC'H F, POST A, WIDMANN M, NEWTON C, HOLSBOER F: Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 1997b; 51:535-541
- [53] PEREIRA C, SANTOS MS, OLIVEIRA C: Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by $\text{A}\beta$ -peptides on PC12 cells. Protection by antioxidants. *Neurobiol Dis* 1999; 6:209-219
- [54] PEREIRA C, GRAZINA MM, OLIVEIRA C; β -Amyloid protein impairs mitochondrial function. Em: *Mitochondrial ubiquinone (coenzyme Q10): biochemical, functional, medical and therapeutic aspects in human health and diseases.* (Eds. Ebadi, M.; Marwah, J. e Chopra, R. K.) 2001; vol. 2:282-300
- [55] PEREIRA C, SANTOS MS, OLIVEIRA C: Mitochondrial function impairment induced by amyloid β -peptide on PC12 cells. *NeuroReport* 1998; 9:1749-1755
- [56] BUTTERFIELD DA, HENSLEY K, HARRIS M, MATTSON MP, CARNEY J: β -Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200:710-715
- [57] HENSLEY K, CARNEY JM, MATTSON MP, AKSENOVA M, HARRIS M, WU JF, FOYD R, BUTTERFIELD DA: A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3270-3274
- [58] PAPPOLLA MA, SOS M, OMAR RA, BICK RJ, HICKSON-BICK DLM, REITER RJ, EFTHIMIOPOULOS S, ROBAKIS NK: Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci* 1997; 17:1683-1690
- [59] SHIBOTA M, KAKIHANA M, NAGAOKA A: The effect of vinpocetine on the brain glucose uptake in mice. *Folia pharmacol Jap* 1982; 80:221-224
- [60] WEISS JH, PIKE CJ, COTMAN CW: Ca^{2+} channel blockers attenuate β -amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture. *J Neurochem* 1994; 62:372-375
- [61] UEDA K, SHINOHARA S, YAGAMI T, ASAKURA K, KAWASAKI K: Amyloid β protein potentiates Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem* 1997; 68:265-271
- [62] MATTSON MP, CHENG B, DAVIS D, BRYANT K, LIEBERBURG I, RYDEL RE: β -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 1992; 12:379-389
- [63] MATTSON MP, TOMASELLI K, RYDEL RE: Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated β -amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res* 1993; 621:35-49
- [64] GOODMAN Y, STEINER MR, STEINER SM, MATTSON MP: Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid β -peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res* 1994; 654:171-176
- [65] FUKUYAMA R, WADHWANI KC, GALDZICKI Z, RAPOPORT SI, EHRENSTEIN G: β -Amyloid polypeptide increases calcium-uptake in PC12 cells: a possible mechanism for its cellular toxicity in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1994; 667:269-272
- [66] YALLAMPALLI S, MICCI M-A, TAGLIALATELA G: Ascorbic acid prevents β -amyloid-induced intracellular calcium increase and cell death in PC12 cells. *Neurosci Lett* 1998; 251:105-108
- [67] THAL LJ, SALMON DP, LASKER B, BOWER D, KLAUBER MR: The safety and lack of efficiency of vinpocetine in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 1989; 37:515-520
- [68] TANG Y-P, NODA Y, HASEGAWA T, NABESHIMA T: Effects of VA-045 on learning and memory deficits in traumatic brain injury (TBI)-induced retrograde and anterograde amnesia mice. *Brit J Pharmacol* 1997; 122:257-264