



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Ocimum americanum***

**Cláudia Vanzella**

**Orientador: Carlos Alexandre Netto**

**Co-Orientadora: Ionara Rodrigues Siqueira**

**Porto Alegre, 2012.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Ocimum americanum***

**Cláudia Vanzella**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica.**

**Orientador: Carlos Alexandre Netto**

**Co-Orientadora: Ionara Rodrigues Siqueira**

**Porto Alegre, 2012.**

*Aos meus pais, Odila e Cláudio Vanzella...*

*“E você aprende que realmente pode suportar...que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais”.*

*Shakespeare*

*“Preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer”.*

*Luis Fernando Veríssimo*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando meus caminhos, iluminando meus passos, me dando força, sabedoria e perseverança para enfrentar os desafios e as dificuldades ao longo do caminho.

Aos meus pais, pelo amor e carinho, pela dedicação ao longo desses dois anos, mas principalmente pelo exemplo de vida, que me ajudou a ser persistente para alcançar os meus objetivos.

Ao meu grande amor, ou melhor, meu benzinho...obrigada por estar sempre presente apesar da distância nos momentos de alegria e também de dificuldades.

Ao meu irmão, Arthur, pelos momentos de alegria, descontração e pela amizade.

Ao professor Alex, pela confiança e pela oportunidade; cursar o mestrado em bioquímica sempre foi o meu grande sonho!

À professora Ionara, minha mãe científica, pois foi quem me deu a oportunidade de conhecer a “vida científica” e quem me acolheu quando decidi que iria cursar o mestrado. Agradeço pela confiança e dedicação, paciência, crítica, empenho e estímulo.

À minha grande amiga e ex-colega de graduação, Graziela Dreyer, que foi a grande incentivadora para eu cursar uma pós-graduação, agradeço muito pela força e pelo carinho, por estar sempre presente apesar de estar tão longe daqui, seu apoio foi muito importante durante toda essa trajetória.

À minha amiga Juliana, pelo carinho e pela força principalmente durante a fase final desta caminhada.

Aos queridos colegas de laboratório, grandes companheiros nos momentos bons e também naqueles mais difíceis; Gisele, Karine, Arthiese, Viviane, Vera, Felipe, Christiano e Eduardo. Agradeço em especial a Gisele pelo companheirismo e pela motivação que foram muito importantes durante todos os momentos.

Agradeço também à minha amiga e colega de mestrado, Adriana Vizuite, que foi uma grande parceira e companheira durante esse dois anos.

A todos, que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho e para que o meu sonho de ser mestre em bioquímica se tornasse realidade.

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                       | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                  | ix   |
| APRESENTAÇÃO .....   | x    |
| RESUMO .....   | xi   |
| ABSTRACT .....   | xii  |
| PARTE I - INTRODUÇÃO .....                                   | 1    |
| 1. Envelhecimento .....                                      | 2    |
| 2. Doenças Neurodegenerativas.....                           | 7    |
| 3. Plantas Medicinais como Estratégias de Neuroproteção..... | 8    |
| 3.1. <i>Ocimum americanum</i> .....                          | 11   |
| 4. Objetivos.....  | 13   |
| 4.1. Objetivo Geral.....                                     | 13   |
| 4.2. Objetivos Específicos .....                             | 13   |
| PARTE II - RESULTADOS .....                                  | 14   |
| PARTE III - DISCUSSÃO.....                                   | 48   |
| PARTE IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                  | 55   |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 1.</b> Desenho esquemático demonstrando a ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B por alterações no estado redox celular.....  | 4  |
| <b>FIGURA 2.</b> Desenho esquemático para explicar a influência do processo de envelhecimento no fenótipo da microglia.....   | 5  |
| <b>FIGURA 3.</b> Desenho esquemático simplificado da comunicação diferencial entre as células leptomeningeais, microglias, astrócitos e neurônios corticais em ratos jovens e de meia-idade durante a inflamação.....   | 6  |
| <b>FIGURA 4.</b> Esquema simplificado para explicar como o aumento das espécies reativas de oxigênio durante o envelhecimento pode levar à inflamação e aos déficits de aprendizado e memória dependentes da idade..... | 7  |
| <b>FIGURA 5.</b> Foto ilustrativa de <i>Ocimum americanum</i> (Lamiaceae).....  | 11 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>AChE</b>                       | acetilcolinesterase                                |
| <b>COX-2</b>                      | ciclooxigenase-2                                   |
| <b>DA</b>                         | Doença de Alzheimer                                |
| <b>EROS</b>                       | espécies reativas de oxigênio                      |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | peróxido de hidrogênio                             |
| <b>IκB</b>                        | inibidor kappa-B                                   |
| <b>IKK</b>                        | inibidor kappa cinase                              |
| <b>IL-1β</b>                      | interleucina-1beta                                 |
| <b>IL-4</b>                       | interleucina-4                                     |
| <b>IL-6</b>                       | interleucina-6                                     |
| <b>IL-10</b>                      | interleucina-10                                    |
| <b>NADPH oxidase</b>              | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase |
| <b>NFκB</b>                       | fator nuclear kappa-B                              |
| <b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> | radical ânion superóxido                           |
| <b>OH<sup>•</sup></b>             | radical hidroxil                                   |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>           | peroxinitrito                                      |
| <b>TAR</b>                        | total antioxidant reactivity                       |
| <b>TGF-β1</b>                     | fator de crescimento transformador-beta 1          |
| <b>TNF-α</b>                      | fator de necrose tumoral-alfa                      |
| <b>TRAP</b>                       | total reactive antioxidant potential               |

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída de quatro partes:

**Parte I:** Introdução e Objetivos;

**Parte II:** Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, subdividido em: Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas;

**Parte III:** Discussão final;

**Parte IV:** Referências bibliográficas referentes à Introdução e Discussão final.

## RESUMO

Várias ervas culinárias e especiarias têm sido relatadas como fonte de agentes neuroprotetores inovadores com base na inibição da acetilcolinesterase (AChE), atividades antioxidante e anti-inflamatória. Neste contexto, estudos recentes têm demonstrado as propriedades neuroprotetoras de espécies da família Lamiaceae. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antioxidante e neuroprotetora de *Ocimum americanum* Linn. (Lamiaceae, "alfavaca", "manjeriçã"), uma espécie de manjeriçã que é comumente utilizada como condimento. Fatias hipocâmpais de ratos jovens e envelhecidos foram incubadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *Ocimum americanum* (EEOA) e submetidas à lesão induzida por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); a atividade mitocondrial e a liberação de lactato de desidrogenase (LDH) foram avaliadas. O efeito do tratamento agudo com EEOA sobre a memória aversiva de curta duração e parâmetros bioquímicos em hipocampo de ratos jovens também foi estudado. Além disso, o efeito da suplementação crônica com EEOA em vários parâmetros bioquímicos em hipocampo de ratos jovens e envelhecidos foi avaliado. O  $H_2O_2$  reduziu significativamente a atividade mitocondrial em fatias hipocâmpais de ratos jovens e envelhecidos, e o EEOA reverteu esta redução em fatias hipocâmpais de ratos jovens. Além disso, o  $H_2O_2$  aumentou a liberação de LDH por fatias hipocâmpais de ratos jovens, porém o EEOA reduziu a liberação de LDH em fatias hipocâmpais de ambas as idades. O tratamento agudo com EEOA não alterou a memória aversiva de curta duração, bem como o conteúdo de radicais livres no hipocampo. A administração de dimetil sulfóxido (DMSO) aumentou a lipoperoxidação (LPO), enquanto que a administração aguda do EEOA (gavagem) reverteu o efeito do DMSO. Observou-se um aumento no conteúdo de radicais livres, mas não houve alterações na LPO no hipocampo de ratos envelhecidos. No entanto, a suplementação crônica com o EEOA diminuiu os níveis de radicais livres e a LPO em ratos envelhecidos. Além disso, a suplementação crônica com o EEOA reduziu o conteúdo de TNF- $\alpha$  no hipocampo de ratos jovens e envelhecidos e diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  em ratos jovens. O tratamento agudo com o EEOA e a suplementação crônica não alteraram a atividade da AChE no hipocampo. Nossos resultados sugerem que o EEOA contém compostos neuroprotetores. Podemos propor que as propriedades antioxidantes, bem como a modulação do processo de neuroinflamação, podem estar relacionadas com o efeito neuroprotetor.

## ABSTRACT

Several culinary herbs and spices have been reported as source of innovative neuroprotective agents based on acetylcholinesterase (AChE) inhibition, antioxidant and anti-inflammatory activities. In this context, recent studies have shown the neuroprotective properties of species of the Lamiaceae family. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and neuroprotective action of *Ocimum americanum* Linn. (Lamiaceae, “alfavaca”, “manjeriçã”), a basil species which is commonly used for seasoning. Hippocampal slices from young and aged rats were incubated with different concentrations of ethanol extract of *Ocimum americanum* (EEOA) and submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury; mitochondrial activity and lactate dehydrogenase (LDH) release were evaluated. The effect of acute treatment with EEOA on short-term aversive memory and biochemical parameters in hippocampus from young rats was also studied. In addition, the effect of chronic supplementation of EEOA on several biochemical parameters in hippocampus from young and aged rats was evaluated. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly impaired mitochondrial activity in hippocampal slices from young and aged rats, and EEOA reversed this impaired in young rats. Besides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhanced LDH released by hippocampal slices in young rats; however the EEOA reduced the LDH released in both ages. The acute treatment with EEOA did not alter short-term aversive memory, as well as the content of free radicals in the hippocampus. The administration of the dimethyl sulfoxide (DMSO) increased the lipid peroxidation (LPO) whereas the acute administration of EEOA (gavage) reversed the DMSO effect. We observed an increased in free radicals content while there was no changes on LPO in hippocampus from aged rats. However, the chronic supplementation with EEOA decreased the free radical levels and LPO in aged rats. Moreover, EEOA chronic supplementation reduced TNF- $\alpha$  content in the hippocampus from young and aged rats and decreased IL-1 $\beta$  levels in young rats. The acute treatment with EEOA and the chronic supplementation did not alter AChE activity in hippocampus. Our findings suggest that the EEOA contains neuroprotective compounds. We can propose that the antioxidant properties, as well as the modulation on neuroinflammation process, can be related to neuroprotective effect.

## **PARTE I - INTRODUÇÃO**

---

## 1. ENVELHECIMENTO

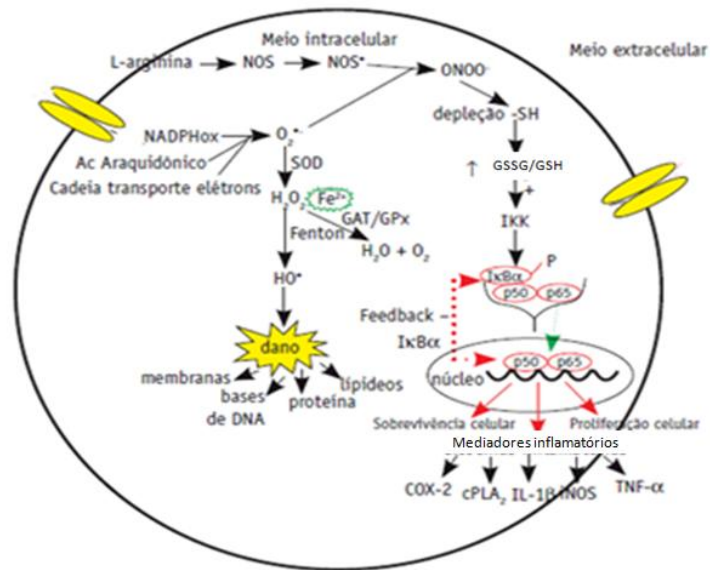
O envelhecimento é um processo complexo, caracterizado pelo declínio das funções fisiológicas e bioquímicas da maioria dos órgãos, levando a um aumento na susceptibilidade a várias doenças associadas à idade (Paradies et al., 2011). No Brasil, estima-se que em 50 anos aproximadamente 30% da população estará na faixa etária acima dos 65 anos (IBGE, 2008). Estes dados são relevantes uma vez que demonstram a importância da pesquisa sobre o envelhecimento normal, podendo assim contribuir para uma melhor qualidade de vida na terceira idade.

Entre as teorias para explicar o processo de envelhecimento, a teoria dos radicais livres e do dano oxidativo (Harman, 1956) tem se tornado especialmente consistente. Várias linhas de evidências apóiam a hipótese de que os radicais livres e o estresse oxidativo estão envolvidos no processo de envelhecimento (Sohal, 2002). Neste contexto, alguns estudos têm demonstrado que durante o envelhecimento há um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) como o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em mitocôndrias (Sohal e Weindruch, 1996; Beckman e Ames, 1998). Além disso, há também uma redução nas defesas antioxidantes (Sanz et al., 1997).

O cérebro é particularmente susceptível aos efeitos prejudiciais das EROS, devido à sua alta taxa metabólica e sua capacidade de regeneração celular diminuída em relação à outros órgãos. Isto, somado com a redução das defesas antioxidantes e dos mecanismos de reparo durante o envelhecimento, resulta no acúmulo de dano oxidativo, o que pode levar a doenças neurodegenerativas. Além disso, existem interações entre o estresse oxidativo e outros mecanismos moleculares que podem causar

neurodegeneração, como a ativação de células gliais, disfunção mitocondrial e morte celular programada (Andersen, 2004).

Por outro lado, as EROS também são reconhecidas como importantes moléculas sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune. Sabe-se que células fagocitárias, como as microglias no sistema nervoso central, são ativadas sob condições oxidativas (Figura 1) (Halliwell, 2007). Essa ativação pode ser mediada pelo sistema da NADPH oxidase e resulta num marcado incremento no consumo de oxigênio e conseqüente produção do  $O_2^{\cdot-}$ . Este radical pode reagir com óxido nítrico formando o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ), uma espécie reativa de nitrogênio, que pode depletar os grupamentos tióis e com isso alterar o balanço redox da glutathiona. Este desequilíbrio no estado redox induz o inibidor kappa cinase (IKK) a fosforilar o inibidor kappa-B ( $I\kappa B$ ), que promove a ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B ( $NF\kappa B$ ) através da sua translocação para dentro do núcleo. A ativação do  $NF\kappa B$  leva à transcrição de diversos mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), a interleucina-1 $\beta$  ( $IL-1\beta$ ), ciclooxigenase-2 ( $COX-2$ ), entre outros (Oktyabrsky e Smirnova, 2007).

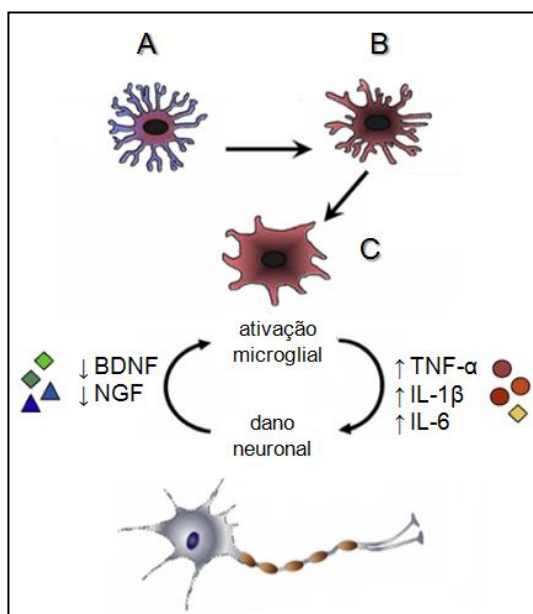


**Figura 1** – Desenho esquemático demonstrando a ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NFκB) por alterações no estado redox celular. O NFκB é um dímero que consiste nas proteínas p50 e p65, que estão presentes no citosol ligadas à uma proteína inibidora, o IκB. A fosforilação desta proteína inibidora promove a translocação do NFκB para o núcleo e conseqüentemente a sua ativação, o que resulta na transcrição de vários mediadores pró-inflamatórios (adaptado de Filippin et al., 2008).

Evidências recentes sugerem que o microambiente cerebral durante o envelhecimento normal é caracterizado pelo aumento da reatividade da microglia e por inflamação crônica (Figura 2). A microglia com um fenótipo reativo é normalmente referida como “sensibilizada” devido à alterações na sua morfologia (desramificação e aumento do citoplasma) e a uma maior liberação de citocinas quando comparada com a microglia não reativa. Embora a microglia “sensibilizada” tenha sido descrita pela primeira vez em associação com doenças crônico-degenerativas, evidências crescentes sugerem que este fenótipo também está presente no cérebro durante o envelhecimento normal (Bilbo, 2010). A alteração da reatividade microglial pelo envelhecimento pode contribuir para o dano neuronal bem como para a perda de mecanismos neuroprotetores e neuroregulatórios; assim, os neurônios não conseguem fazer o controle adequado da



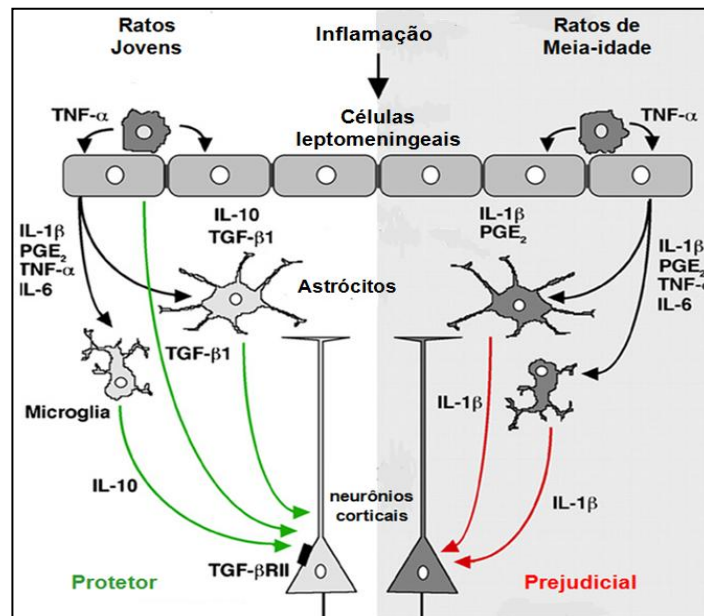
reatividade glial, o que pode levar a um ciclo vicioso. Como resultado da ativação microglial persistente e da perda da integridade neuronal pode haver prejuízos neurocomportamentais prolongados e neuroinflamação crônica (Jurgens e Johnson, 2012).



**Figura 2** – Desenho esquemático para explicar a influência do processo de envelhecimento no fenótipo da microglia: (A) microglia não reativa, com morfologia ramificada; (B) microglia “sensibilizada”, com reatividade e morfologia alteradas pelo envelhecimento. A ativação microglial promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) (C) que podem causar dano aos neurônios. Assim, os neurônios perdem os mecanismos neuroprotetores e neuroregulatórios (BDNF, NGF) que são importantes para manter a microglia em seu estado não reativo (adaptado de Jurgens e Johnson, 2012).

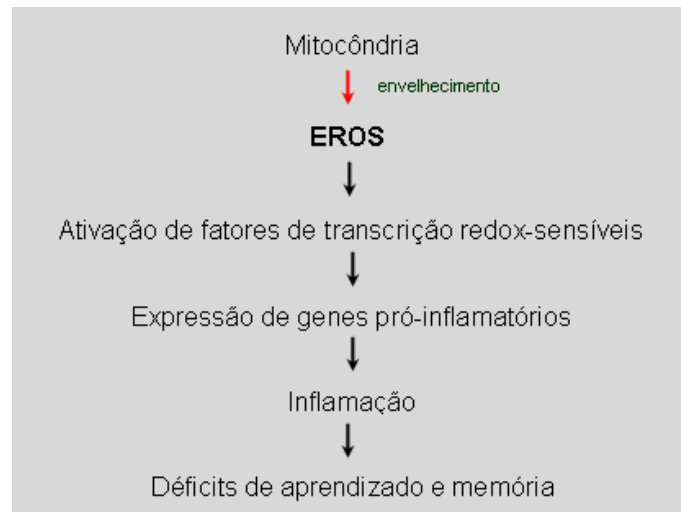
Neste contexto, Wu e colaboradores (2008) demonstraram que dependendo da idade as células da glia podem liberar diferentes tipos de citocinas em resposta a um mesmo estímulo (Figura 3). Astrócitos e microglias produzem citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1)

em ratos jovens em resposta à inflamação (Wu et al., 2005). Contudo, estas mesmas células em ratos de meia-idade produzem mais citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , do que citocinas anti-inflamatórias. Estas observações sugerem que, o processo inflamatório ativa as células da glia, as quais podem se transformar em células fenotipicamente diferenciadas: células anti-inflamatórias em ratos jovens e células pró-inflamatórias em ratos de meia-idade.



**Figura 3** - Desenho esquemático simplificado da comunicação diferencial entre as células leptomeningeais, microglias, astrócitos e neurônios corticais em ratos jovens e de meia-idade durante a inflamação. As células inflamatórias do sangue, como os macrófagos, ativam as células leptomeningeais que liberam mediadores pró- e anti-inflamatórios. Em ratos jovens, fatores liberados pelas células leptomeningeais ativam microglias e astrócitos que liberam IL-10 e TGF- $\beta$ 1 (citocinas anti-inflamatórias), que podem ter influência protetora sobre os neurônios corticais. Em contraste, em ratos de meia-idade, fatores liberados pelas células leptomeningeais ativam as microglias e os astrócitos que liberam principalmente IL-1 $\beta$  (uma citocina pró-inflamatória) que pode ter influência prejudicial sobre os neurônios corticais (adaptado de Nakanishi e Wu, 2009).

Assim, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias no cérebro pode levar a alterações comportamentais e ao prejuízo cognitivo (Figura 4). Estas citocinas podem atuar diretamente sobre os neurônios do hipocampo reduzindo a plasticidade sináptica. Além disso, o hipocampo é a estrutura que apresenta a maior densidade de receptores de citocinas pró-inflamatórias e parece ser particularmente vulnerável ao envelhecimento e à inflamação (Mattson e Magnus, 2006; Wilson et al., 2002).



**Figura 4** – Esquema simplificado para explicar como o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) durante o envelhecimento pode levar à inflamação e aos déficits de aprendizado e memória dependentes da idade (adaptado de Nakanishi e Wu, 2009).

## 2. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Com o aumento da expectativa de vida, estima-se que ocorra um aumento na incidência de doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento, como as Doenças de Alzheimer (DA) e de Parkinson.

Dessa forma, a pesquisa sobre o envelhecimento normal pode contribuir para uma melhor qualidade de vida na terceira idade, sendo ainda essencial para o

desenvolvimento de novas abordagens, tanto para modular as disfunções ligadas ao envelhecimento normal, quanto para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, já que as disponíveis têm eficácia limitada.

Dentre as doenças neurodegenerativas, destaca-se a DA, uma desordem neurodegenerativa que é responsável por 50-60% do número total de casos de demência entre pessoas acima dos 65 anos (Viegas et al., 2004). No que diz respeito ao tratamento farmacológico, inúmeras substâncias têm sido propostas para preservar ou restabelecer a cognição, o comportamento e as habilidades funcionais do paciente com demência. Contudo, os efeitos dos fármacos hoje aprovados para o tratamento da DA limitam-se por promover melhora dos sintomas e com isso da qualidade de vida, não alterando a progressão da doença (Forlenza, 2005). Assim, estudos voltados para a busca de substâncias ativas com mecanismos de ação múltiplos podem ser interessantes no manejo de doenças neurodegenerativas, em especial, da DA.

### **3. PLANTAS MEDICINAIS COMO ESTRATÉGIAS DE NEUROPROTEÇÃO**

As evidências para o envolvimento do dano oxidativo no processo de envelhecimento sugerem que um aumento da ingestão de antioxidantes pode ser benéfico para preservar a função cerebral. Além disso, estudos tem demonstrado que a suplementação de longo prazo com extratos de plantas com propriedades antioxidantes retarda os déficits neuronais relacionados à idade em roedores (Villeponteau et al., 2000; Bickford et al., 2000). Neste contexto, diversas ervas aromáticas e especiarias têm sido avaliadas no que diz respeito às suas ações biológicas no tratamento de doenças crônicas (Loizzo et al, 2009; Menichini et al, 2009) e seus papéis funcionais tem sido um tópico importante na pesquisa com plantas relacionadas à alimentação (Loizzo et al., 2010).

Várias plantas aromáticas, além do uso como condimento, são usadas no tratamento de diversos sintomas e doenças, muitas destas espécies vegetais pertencem à família Lamiaceae (Labiatae). *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), conhecida popularmente como alecrim e alecrim-de-jardim, é originária do Mediterrâneo, e suas folhas e inflorescências são usadas popularmente como tônica, estimulante, antifebril, no alívio da dor de cabeça e da tensão nervosa; esta espécie contém no óleo essencial, compostos terpênicos e um alto teor de flavonóides, algumas das substâncias são o carnosol, ácido carnôico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, ácido rosmínico, rosmaridifenol e rosmariquinona, luteolina e a hesperidina (Okamura et al., 1994). Alguns trabalhos demonstram uma acentuada atividade antioxidante de extratos e compostos obtidos desta espécie (Okamura et al., 1994) e vários trabalhos sugerem-na como aditivo alimentar, como alternativa aos antioxidantes sintéticos, a fim de estabilizar quimicamente os alimentos gordurosos evitando assim a rancificação (Madsen et al., 1998; Aruoma et al., 1996). Vários compostos foram isolados de *Salvia officinalis* L. (sálvia, Lamiaceae), como: salvigenina, lupeol, beta-sitosterol, estigmasterol, fisiona, carnosol, rosmadiol, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, columbaridiona, atuntzensina A, miltirona, carnosol e ácido carnôico (Miura et al., 2001). Assim como em *Rosmarinus officinalis*, sugere-se que rosmanol, carnosol e ácido carnôico contribuem fortemente para a atividade antioxidante de *Salvia officinalis* (Santos-Gomes et al., 2002), contudo outros compostos também apresentam estas propriedades (Madsen et al., 1998; Miura et al., 2002).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que diferentes espécies da família Lamiaceae podem ter propriedades neuroprotetoras interessantes na prevenção e/ou tratamento da DA. Foi observada uma melhora cognitiva em pacientes, além de atividades importantes na modulação da patologia, como a inibição da enzima

acetilcolinesterase (AChE) e atividade antioxidante (Eidi et al., 2006; Tildesley et al., 2003; Moss et al., 2003; Perry et al., 2000). A inibição da enzima AChE tem sido uma das poucas estratégias farmacológicas utilizadas em clínica, este uso baseia-se no fato de que uma notável disfunção colinérgica é observada em várias áreas cerebrais dos pacientes acometidos por DA.

Dados da literatura descrevem os efeitos antioxidantes e neuroprotetores dos membros do gênero *Ocimum*. Recentemente foi demonstrado que *Ocimum basilicum* Linn. apresenta propriedades antioxidantes em vários sistemas *in vitro*, as quais têm sido relacionadas ao alto conteúdo de compostos fenólicos e de flavonóides (Jayasinghe et al., 2003; Kaurinovic et al., 2011). Além disso, Bora, Arora e Shri (2011a) demonstraram que o pré-tratamento com o extrato padronizado de *Ocimum basilicum* reduz o tamanho do infarto cerebral e a lipoperoxidação, restaura o conteúdo de glutathiona e atenua os déficits na memória de curta duração e na coordenação motora em camundongos. Ainda, estudos demonstraram que *Ocimum sanctum* Linn., outra espécie do gênero, previne o estresse oxidativo durante a reperfusão e é eficaz em atenuar o declínio no aprendizado e na memória espacial induzido por hipoperfusão em ratos (Yanpallewar et al., 2004).

### 3.1. *Ocimum americanum*

*Ocimum americanum* Linn., conhecido popularmente como alfavaca e manjerição (Figura 5), é uma espécie nativa da Ásia e da África (Paton et al., 1999).



**Figura 5** – Foto ilustrativa de *Ocimum americanum* (Lamiaceae).

Alguns estudos voltados à caracterização fitoquímica de *Ocimum americanum* verificaram que esta espécie apresenta níveis elevados de flavonóides, especialmente nevadensina, que tem atividade antioxidante (Vieira et al., 2003).

Estudos obtidos no nosso laboratório demonstraram uma potente atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de *Ocimum americanum*, evidenciada pela inibição da enzima xantina oxidase, pela redução na concentração de óxido nítrico e pelos altos valores de TRAP (*total reactive antioxidant potential*) e de TAR (*total antioxidant reactivity*), indicando assim, uma alta concentração de compostos antioxidantes e a presença de compostos altamente reativos (Vanzella et al., 2003). É importante ressaltar que o extrato etanólico de *Ocimum americanum* apresentou uma significativa atividade antioxidante *in vivo*. A administração aguda por gavagem deste extrato em camundongos machos adultos aumentou a capacidade antioxidante total e reduziu o conteúdo de radicais livres e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico,

um índice de dano em lipídeos, na estrutura cerebral hipocampo (Vanzella et al., 2004). O extrato etanólico de *Ocimum americanum* inibiu significativamente a atividade *in vitro* da AChE no córtex frontal e no hipocampo (Vanzella et al., 2006). Além de que, a suplementação de camundongos machos adultos com o extrato etanólico de *Ocimum americanum* durante 15 dias melhorou parâmetros de memória avaliados através do *T-maze* (Vanzella et al., 2007). As propriedades dessa espécie relacionadas à melhora da memória são consistentes com a atividade anticolinesterásica *in vitro*, previamente descrita.



## **4.OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito neuroprotetor do extrato etanólico de *Ocimum americanum*.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

I. Avaliar o efeito da administração aguda do extrato etanólico de *Ocimum americanum* sobre a memória aversiva de curta duração, o estado oxidativo celular e atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo de ratos Wistar machos de 3 meses de idade.

II. Estudar o efeito *in vitro* do extrato etanólico de *Ocimum americanum* sobre a susceptibilidade ao dano celular induzido por peróxido de hidrogênio em fatias hipocâmpais de ratos Wistar machos de 3 e 16 meses de idade.

III. Avaliar o efeito da suplementação durante 4 semanas com o extrato etanólico de *Ocimum americanum* sobre o estado oxidativo celular, a atividade da enzima acetilcolinesterase e modulação do processo neuroinflamatório em hipocampo de ratos Wistar machos de 3 e 18 meses de idade.

## **PARTE II – RESULTADOS**

---

## CAPÍTULO I

### NEUROPROTECTIVE AND ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF *Ocimum americanum*

Cláudia Vanzella<sup>a</sup>, Gisele A. Lovatel<sup>b</sup>, Karine Bertoldi<sup>c</sup>, Eduardo F. de Almeida<sup>d</sup>,  
Christiano Spindler<sup>c</sup>, Felipe S. Moysés<sup>c</sup>, Adriana Vizquete<sup>a</sup>, Gilsane L. V. Poser<sup>e</sup>, Carlos  
A. Netto<sup>a</sup>, Ionara R. Siqueira<sup>c,d\*</sup>

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *NUTRITION RESEARCH*

Intruções de autores:

[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/525483/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525483/authorinstructions)

3 **NEUROPROTECTIVE AND ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF *Ocimum americanum***

5 Cláudia Vanzella<sup>a</sup>, Gisele A. Lovatel<sup>b</sup>, Karine Bertoldi<sup>c</sup>, Eduardo F. de Almeida<sup>d</sup>, Christiano  
6 Spindler<sup>c</sup>, Felipe S. Moysés<sup>c</sup>, Adriana Vizueté<sup>a</sup>, Gilsane L. V. Poser<sup>e</sup>, Carlos A. Netto<sup>a</sup>, Ionara R.  
7 Siqueira<sup>c,d\*</sup>

9 <sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da  
10 Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

11 <sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Instituto de Ciências Básicas  
12 da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

13 <sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da  
14 Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

15 <sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande  
16 do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

17 <sup>e</sup>Departamento de Produção de Matéria Prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
18 Alegre, RS, Brazil.

20 \* Corresponding Author: Ionara Rodrigues Siqueira, Departamento de Farmacologia, Universidade  
21 Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS,  
22 Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; E-mail: ionara@ufrgs.br

- 26 **List of Abbreviations:**
- 27 A $\beta$ , amyloid  $\beta$ -peptide;
- 28 AChE, acetylcholinesterase;
- 29 ASCh, acetylthiocholine iodide;
- 30 AD, Alzheimer Disease;
- 31 DCF, oxidized fluorescent derivative;
- 32 DCFH-DA, 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate;
- 33 DMSO, dimethyl sulfoxide;
- 34 EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid;
- 35 EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid;
- 36 EEOA, ethanol extract of *Ocimum americanum*;
- 37 HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid;
- 38 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide;
- 39 IA, inhibitory avoidance;
- 40 iNOS, inducible nitric oxide synthase;
- 41 IL-1 $\beta$ , interleukin-1 beta;
- 42 IL-10, interleukin-10;
- 43 LDH, lactate dehydrogenase;
- 44 LPO, lipid peroxidation;
- 45 MDA, malondialdehyde;
- 46 MTT, 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide;
- 47 NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;
- 48 *O. americanum*, *Ocimum americanum*;
- 49 PBS, phosphate buffer saline;
- 50 PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride;

- 51 ROS, reactive oxygen species;
- 52 TBARS, thiobarbituric acid reactive substances;
- 53 TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor-beta 1;
- 54 TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha;
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65
- 66
- 67
- 68
- 69
- 70
- 71

72 **Abstract**

73 Several culinary herbs have been suggested as sources of innovative neuroprotective agents. It has  
74 been described that some Lamiaceae species have activities potentially relevant to brain function,  
75 which include antioxidant, cholinesterase inhibition and anti-inflammatory properties. Our  
76 hypothesis was that ethanol extract of *Ocimum americanum* (EEOA), known as sweet basil, may has  
77 neuroprotective activity. Hippocampal slices from young and aged rats were incubated with different  
78 concentrations of EEOA and submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury; mitochondrial activity and lactate  
79 dehydrogenase (LDH) released were evaluated. *In vitro* incubation with EEOA reversed the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-  
80 induced decrease on mitochondrial activity in young rats. The EEOA reduced the LDH released by  
81 hippocampus from both ages, demonstrating that this extract can protect neuron membrane against  
82 oxidative damage. The effect of acute treatment with EEOA on short-term aversive memory and  
83 biochemical parameters in hippocampus from young rats was studied. This treatment did not alter  
84 short-term aversive memory and hippocampal free radicals content in young rats. In addition, the  
85 effect of chronic supplementation of EEOA on several biochemical parameters in hippocampus from  
86 young and aged rats was tested. The aging-induced increase of free radical levels, as well as lipid  
87 peroxidation, was reduced by chronic supplementation with EEOA in hippocampus from aged rats.  
88 Moreover, EEOA supplementation reduced the TNF- $\alpha$  content in the hippocampus from young and  
89 aged rats, and IL-1 $\beta$  levels in young rats. This extract did not alter AChE activity. The EEOA  
90 showed neuroprotective effect that can be attributed to its antioxidant and anti-neuroinflammatory  
91 properties.

92

93 **Key Words:** *Ocimum americanum*; Rats; Hippocampus; Neuroprotection; Free radicals; Lipid  
94 peroxidation

95

## 96 **1. Introduction**

97 There are several studies about biological activities of culinary herbs, although investigations about  
98 the effect of supplementation with herbs and spices as regards to the brain function are rare,  
99 especially using anti-aging approaches. Natural products and their components have received  
100 considerable attention as alternative candidates for therapeutic purposes. The long-term  
101 supplementation with plant extracts with antioxidant properties slows age-related neuronal deficits in  
102 rodents [1]. It has been postulated that multitarget drug strategy is an attractive approach to aging  
103 management.

104 Experimental and clinical studies demonstrated memory improve effect of Lamiaceae species [2,3].  
105 Perry and colleagues [4] suggested that Spanish sage (*Salvia lavandulaefolia* Vahl) may be relevant  
106 in the treatment of Alzheimer Disease (AD). Many studies with different *Salvia* species have  
107 revealed activities potentially relevant to brain function, which include antioxidant, cholinesterase  
108 inhibition and anti-inflammatory properties [5,6].

109 A significant body of research has established that oxidative stress is linked to neuronal degeneration  
110 associated with normal aging and chronic neurodegenerative diseases, such as brain ischemia,  
111 reperfusion and AD [7,8]. The oxidative damage is mediated by reactive oxygen species (ROS) that  
112 can attack proteins, lipid membranes and deoxynucleic acids, disrupting cellular function and  
113 integrity [9,10]. The decline in antioxidant defenses and repair mechanisms during aging results in  
114 accumulating of oxidative damage and seems to lead to neurodegenerative disorders [11]. Taken  
115 together, it is possible to suggest that increases in diet intake of antioxidants might be beneficial to  
116 preserve brain function during aging.

117 The antioxidant and neuroprotective effects of members of the genus *Ocimum* (family Lamiaceae)  
118 have been widely described. Recently, it was demonstrated that *Ocimum basilicum* has antioxidant  
119 properties in several *in vitro* systems, which have been associated with the high content of phenolic  
120 compounds and flavonoids [12]. Besides, pre-treatment with *Ocimum basilicum* and *Ocimum*



121 *sanctum* extracts protect against ischemia-reperfusion and hypoperfusion-induced cerebral damage  
122 [13,14]. It has been postulated that nootropic effect of Lamiaceae species might be associated with  
123 cholinergic properties [2-4]. Several studies have reported *in vitro* anticholinesterase activity of  
124 several *Salvia* species, such as *Salvia lavandulaefolia* and *Salvia leriifolia* [15,16].

125 Recent studies have pointed out that normal aging process and neurodegenerative diseases are  
126 associated with inflammatory processes. Indeed, AD involves a chronic neuroinflammatory  
127 response, which is characterized by activated microglia, reactive astrocytes, and increased  
128 inflammatory cytokine expression associated with amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) deposits [17]; in addition,  
129  $A\beta$  has been associated to oxidative stress [18,19]. The pro-inflammatory cytokines can act directly  
130 on neurons in the hippocampus and impair synaptic plasticity, since the hippocampus has a high  
131 density of pro-inflammatory cytokine receptors [20,21]. However, there are no published studies  
132 investigating the modulation of Lamiaceae species on neuroinflammation parameters.

133 In the present work attention was focused particularly on *Ocimum americanum* (Lamiaceae,  
134 “alfavaca”, “manjeriçao”, “sweet basil”), a native species to Asia and Africa [22], which is commonly  
135 used for seasoning [23], the hypothesis is that *Ocimum americanum* might have neuroprotective and  
136 antioxidant activities.

137 The aim of this study was to investigate (1) the effect of acute treatment with ethanol extract of  
138 *Ocimum americanum* (EEOA) on short-term memory for aversive training in young adult rats, in  
139 addition to cellular oxidative state and AChE activity in hippocampus, (2) the *in vitro* protective  
140 effect of the EEOA on  $H_2O_2$ -induced cell damage in hippocampal slices from young adult and aged  
141 rats and (3) the effect of chronic administration of EEOA on several biochemical parameters, cellular  
142 oxidative state, AChE activity and neuroinflammatory parameters, of hippocampus from young adult  
143 and aged rats.

144

145

## 146 **2. Materials and Methods**

### 147 *2.1. Plant Material and Preparation of the Ethanol Extract*

148 *Ocimum americanum* (Lamiaceae) was collected in Rio Grande do Sul State (Brazil) and  
149 authenticated by Mara Rejane Ritter (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS,  
150 RS, Brazil). Voucher specimens were deposited in the Herbario do Vale do Taquari (HVAT 1922)  
151 Botany and Paleobotany Sector of UNIVATES Natural Science Museum (Lajeado, Rio Grande do  
152 Sul State, Brazil). One hundred grams of fresh leaves of *O. americanum* was soaked in 1000 mL of  
153 ethanol (90%) for 7 days in room temperature. The solvent was filtered and dried under vacuum,  
154 resulting in the ethanol extract (EEOA). For the *in vitro* assays EEOA initially dissolved in 1%  
155 dimethyl sulfoxide (DMSO) was further adjusted, so that a maximum final concentration of 0.001%  
156 DMSO was present in EEOA-treated samples.

157

### 158 *2.2. Animals*

159 Male Wistar rats aged 3 and 16-18 months, maintained under standard conditions (12 h light/dark,  
160 22±2 °C) with food and water *ad libitum* were used. The NIH “Guide for the Care and Use of  
161 Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996) was followed in all experiments.  
162 The Local Ethics Committee approved all handling and experimental conditions (document number  
163 GPPG-HCPA 09-638).

164

### 165 *2.3. Effect of acute treatment with EEOA*

#### 166 *2.3.1. Animals and Treatment*

167 Male Wistar rats of 3 months of age were treated with saline, solvent (DMSO 20%) or EEOA (100  
168 and 300 mg/kg) by gavage. Animals received treatment immediately after single training on  
169 inhibitory avoidance and were tested for short-term memory 90 minutes after training. Behavioral  
170 observations were performed in soundproof rooms during the same period of the day.

171 *2.3.2. Inhibitory avoidance task*

172 The single-trial step-down inhibitory avoidance (IA) conditioning as an established model of fear-  
173 motivated memory was employed [24]. The IA behavioral training and retention test procedures  
174 were described in previous reports [25]. The IA apparatus was a 50 cm×25 cm×25 cm acrylic box  
175 (Albarsch, Porto Alegre) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm  
176 diameter) spaced 1 cm apart. A 7 cm wide, 2.5 cm high platform was placed on the floor of the box  
177 against the left wall. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step  
178 down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after  
179 stepping down on the grid, rats received a 0.5 mA, 2.0 s foot shock and were removed from the  
180 apparatus. The test trials were procedurally identical to training, except that no foot shock was  
181 presented. Step-down latencies on the test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA  
182 retention.

183

184 *2.3.3. Tissue preparation*

185 Rats were decapitated 30 minutes after the test on inhibitory avoidance; hippocampi were quickly  
186 dissected out and instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at -70°C until biochemical  
187 assays. For assays of cellular oxidative state, the hippocampi were homogenized in 10 volumes of  
188 ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, 2mM)  
189 and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1mM) in a Teflon-glass homogenizer. The homogenate  
190 was centrifuged at 960 x g for 10 min and the supernatant was used for the assays. To evaluate the  
191 acetylcholinesterase activity, the hippocampi were homogenized in 10 volumes of ice-cold phosphate  
192 buffer (0.5 M, pH 7.5) and centrifuged at 900 x g for 10 min. The resulting supernatants were used as  
193 the enzyme source.

194

195

196 *2.3.4. Free radical levels*

197 To assess the free radicals content it was used 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a  
198 probe [26]. An aliquot of the sample was incubated with DCFH-DA (100  $\mu$ M) at 37°C for 30 min.  
199 The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and  
200 emission wavelengths of 488 nm 525 nm, respectively. All procedures were performed in the dark  
201 and blanks containing DCFH-DA (no supernatant) were processed for measurement of  
202 autofluorescence [27].

203

204 *2.3.5. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)*

205 Lipid peroxidation (LPO) was evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test  
206 [28]. Aliquots of samples were incubated with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric  
207 acid. The mixture was heated (30 min) on a boiling water bath. Afterwards, n-butanol was added and  
208 the mixture was centrifuged. The organic phase was collected to measure fluorescence at excitation  
209 and emission wavelengths of 515 and 553 nm, respectively. 1,1,3,3-tetramethoxypropane, which is  
210 converted to malondialdehyde (MDA), was used as standard.

211

212 *2.3.6. Acetylcholinesterase activity*

213 Acetylcholinesterase (AChE) activity was determined by slight modifications of the colorimetric  
214 method described by Ellman et al. [29], using acetylthiocholine iodide (ASCh) as a substrate. The  
215 total volume of reaction mixtures was 300  $\mu$ L (10  $\mu$ L of supernatant, 30  $\mu$ L of Ellman's reagent  
216 [0.01 M 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)], 30  $\mu$ L of substrate (ASCh), 230  $\mu$ L of buffer), and  
217 each sample of the enzyme source material was analyzed in triplicate. The blank reading was  
218 obtained for each reaction mixture after 10 min of incubation, before the addition of ASCh (75 mM).  
219 Thereafter, absorbance (412 nm) readings were taken for 4 min at 30-s intervals.

220

221 *2.3.7. Protein determination*

222 Protein was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [30].

223

224 *2.4. In vitro neuroprotective effect of EEOA*

225 *2.4.1. Animals, preparation and incubation of hippocampal slices*

226 Male Wistar rats aged 3 and 16 months were sacrificed by decapitation and the hippocampi were  
227 quickly dissected out and transverse sections (400  $\mu$ m) were prepared using a McIlwain Tissue  
228 Chopper. Slices were then transferred immediately into 24-well plates, each well containing 0.3 mL  
229 of HEPES-saline buffer (containing in mM): 120 NaCl; 25 HEPES; 10 glucose; 2 KCl; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1  
230 MgSO<sub>4</sub>; 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; adjusted to pH 7.4. The medium was changed after 30 min by fresh buffer and  
231 the slices were incubated with different concentrations of the EEOA (0, 0.1, and 1  $\mu$ g/mL) for 60 min  
232 at 35°C. The medium was then changed for fresh buffer in the absence or presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mM)  
233 for 60 min at 35°C [31]. After incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cellular viability (mitochondrial activity) and  
234 cell damage (membrane lyses) assays were performed.

235

236 *2.4.3. Cellular viability*

237 Mitochondrial activity was evaluated by the colorimetric 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl  
238 tetrazolium bromide (MTT) method. Hippocampal slices were incubated for 30 min at 35°C in the  
239 presence of MTT (5 mg/mL). Active mitochondrial dehydrogenases of living cells cause cleavage  
240 and reduction of the soluble yellow MTT dye to the insoluble purple formazan, which was extracted  
241 in DMSO; the optical density was measured at 560/630 nm [32].

242

243 *2.4.2. Cellular damage*

244 Cell damage was quantified by measuring lactate dehydrogenase (LDH) released into the medium  
245 [33]. After 60 min of incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LDH activity was determined using a commercial kit

246 (Doles Reagents, Goiânia, Brazil). Each experiment was normalized by subtracting the background  
247 levels of LDH produced from the control wells. Samples were quantified using a standard curve; the  
248 optical density was measured at 490 nm.

249

## 250 *2.5. Effect of chronic administration of EEOA*

### 251 *2.5.1. Animals and EEOA supplementation*

252 Male Wistar rats aged 3 and 18 months were randomly divided into six groups and fed diet with or  
253 without EEOA supplementation during 4 weeks (Table 1). The animals received *ad libitum* the  
254 experimental diets, 0% (control diet), 0.01% (diet supplemented with EEOA at a final concentration  
255 of 0.1 g/kg) and 0.2% (diet supplemented with EEOA at a final concentration of 2 g/kg) [34,35]. The  
256 animals were observed daily for clinical signs of toxicity and mortality to clarify the toxicity profile  
257 of EEOA.

258

### 259 *2.5.2. Tissue preparation*

260 After 4 weeks of supplementation, rats were decapitated and the hippocampi were quickly dissected  
261 out and instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at -70°C until biochemical assays. For  
262 measurement of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  content, hippocampus was homogenized in phosphate buffer  
263 saline (PBS, pH 7.4), containing 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and 1 mM PMSF.  
264 The homogenate was centrifuged at 1000 X g for 5 min at 4°C and the supernatant was used. To  
265 evaluate the cellular oxidative state and acetylcholinesterase activity, the hippocampus was  
266 homogenized and procedures experimental was conducted as describe above.

267

268

269

270

271 *2.5.3. Measurement of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  content*

272 The levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the hippocampus were determined using Ready-To-Go Cytokine  
273 Elisa Kit (eBioscience, catalog number 88-7346 and 88-6010, respectively) according to  
274 manufacturer protocol. Protein content was measured by Lowry method [36].

275

276 **2.6. Statistical Analysis**

277 Results are expressed as percentage of control and are displayed as median (25th/75th percentiles) or  
278 mean ( $\pm$ SEM). The pattern of distribution was assessed before statistical testing. The inhibitory  
279 avoidance task and the acetylcholinesterase activity did not exhibit homogeneity of variance and we  
280 employed the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's test. The effect of acute  
281 treatment was assessed by One-way ANOVA and post hoc Tukey test. The *in vitro* neuroprotective  
282 and chronic supplementation effects were evaluated by Two-way ANOVA followed by the Tukey  
283 test. The *in vitro* neuroprotective results considered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and treatment as factors. The chronic  
284 supplementation results considered age and supplementation as factors. Significance was assumed as  
285  $p < 0.05$ .

286

287 **3. Results**

288 *3.1. Effect of acute treatment with EEOA in young adult rats*

289 Latencies to step down from the platform during training did not differ among groups (data not  
290 shown). The immediately post-training acute treatment with EEOA did not alter the short-term  
291 aversive memory evaluated in the inhibitory avoidance task. The acute treatment with EEOA did not  
292 modify the content of free radicals in hippocampus, evaluated by formation of the DCF (data not  
293 shown). The administration (v.o.) of DMSO significantly increased the LPO levels when compared  
294 to saline group, and the 300 mg/kg EEOA was able to reduce the LPO to control levels (Fig. 1,

295  $F_{(3,20)}=17.78$ ;  $p<0.0001$ ). In addition, the acute administration of EEOA did not alter the AChE  
296 activity in hippocampus from young adult rats (data not shown).

297

### 298 *3.2. In vitro neuroprotective effect of EEOA in young adult and aged rats*

299 The  $H_2O_2$  significantly impaired mitochondrial activity in hippocampal slices from young and aged  
300 rats (Fig. 2A,  $F_{(1,36)}=22.164$ ,  $p<0.0001$ ; Fig. 2B,  $F_{(1,44)}=93.416$ ,  $p<0.0001$ ; respectively). The *in vitro*  
301 incubation with 1  $\mu\text{g/mL}$  EEOA reversed the  $H_2O_2$  -induced decrease on mitochondrial activity in  
302 hippocampal slices from young rats ( $p=0.05$ ), but not from aged rats. Besides, there was a significant  
303 interaction between two factors,  $H_2O_2$  and EEOA ( $F_{(2,36)}=5.530$ ,  $p=0.042$ ).

304 The  $H_2O_2$  enhanced the LDH released into the incubation medium by hippocampal slices from young  
305 rats (Fig. 3A,  $F_{(1,33)}=14.532$ ,  $p=0.001$ ), but not from aged rats (Fig. 3B). Interestingly, the *in vitro*  
306 incubation with 1  $\mu\text{g/mL}$  EEOA reversed the  $H_2O_2$  -induced increase in LDH released by slices from  
307 young rats ( $F_{(2,33)}=4.956$ ,  $p=0.014$ ), in addition it was able to reduce the LDH released from aged  
308 ones ( $F_{(2,41)}=5.315$ ,  $p=0.009$ ). Two-way ANOVA showed interaction between two factors,  $H_2O_2$  and  
309 EEOA ( $F_{(2,41)}=3.591$ ,  $p=0.038$ ).

310

### 311 *3.3. Effect of EEOA supplementation in young adult and aged rats*

312 An age-dependent effect on free radical level was found (Fig. 4A,  $F_{(1,39)}=4.311$ ,  $p=0.046$ ) with a  
313 significant increase in hippocampus from aged control rats. The supplementation with EEOA (0.01  
314 and 0.2%) during 4 weeks decreased the content of free radicals in hippocampus from aged rats  
315 comparing to those obtained from aged control group (Fig. 4A,  $p<0.0001$ ). Interestingly, the EEOA  
316 did not modify the content of free radicals in hippocampus from young rats. Besides, there was  
317 significant interaction between two factors, age and EEOA supplementation ( $F_{(2,39)}=18.669$ ,  
318  $p<0.0001$ ). We did not observe an increase in the TBARS levels, an index of damage to  
319 macromolecules, in aged control rats. However, the supplementation with 0.01% EEOA reduced the



320 TBARS levels in aged rats (Fig 4B,  $p=0.032$ ), but not in young rats. Furthermore, two-way ANOVA  
321 showed the effect of EEOA supplementation ( $F_{(2,31)}=3.354$ ,  $p=0.051$ ). The chronic supplementation  
322 with EEOA at tested doses did not modify the AChE activity in both ages (data not shown).  
323 The modulation of EEOA supplementation on neuroinflammatory process in the hippocampus from  
324 young and aged rats was evaluated. The EEOA reduced the content of TNF- $\alpha$  in the hippocampus  
325 from young and aged rats (Fig. 5A,  $p=0.005$ ). Moreover, two-way ANOVA showed the effect of  
326 EEOA supplementation ( $F_{(2,27)}=8.421$ ,  $p=0.002$ ) and an interaction between age and EEOA  
327 supplementation ( $F_{(2,27)}=4.161$ ,  $p=0.029$ ). The EEOA (0.01% and 0.2%) decreased the content of IL-  
328 1 $\beta$  in the hippocampus from young rats (Fig. 5B,  $p<0.0001$ ), while, there was a trend from aged ones  
329 ( $p=0.087$ ). Two-way ANOVA revealed the effect of age and EEOA supplementation ( $F_{(1,31)}=15.049$ ,  
330  $p=0.001$ ;  $F_{(2,31)}=16.848$ ,  $p<0.0001$ ; respectively) . Besides, there was interaction between two factors,  
331 age and EEOA supplementation ( $F_{(2,31)}=5.296$ ,  $p=0.012$ ).

332

#### 333 **4. Discussion**

334 The results clearly demonstrated that the extract of *O. americanum* protected hippocampal slices  
335 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mechanistically, *O. americanum*-mediated neuroprotection can be attributed to its  
336 antioxidant and anti-neuroinflammatory properties. To our knowledge, this is the first work  
337 investigating the *O. americanum* effects in both young adult and aged ages.

338 The incubation of hippocampal slices from both 3- and 16-months-old rats with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in  
339 marked changes in cellular viability (MTT assay). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is widely used as an oxidative injury  
340 model in rat hippocampal slices [31]. It is important to note that the oxidative damage by ROS may  
341 lead to several alterations in membranes, including its molecular structure, producing significant  
342 changes in the biophysical properties [37]. Unexpected, the incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhanced LDH  
343 released to the incubation medium by hippocampal slices from 3-months-old rats but not from 16-  
344 months-old rats. Our results indicate that hippocampal slices from aged rats may respond to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

345 brain injury differently than those from young rats. We cannot explain this difference, although it is  
346 possible to suggest that the hippocampal cell membranes could adapt to higher free radical levels,  
347 since basal free radical content in old hippocampus homogenates rats was higher than young ones  
348 [38]. Although it was previously described that aged hippocampal cell membranes are particularly  
349 susceptible to *in vitro* ischemic damage [11].

350 Several studies have shown the neuroprotective action of species of the Lamiaceae family against the  
351 oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in different cell types. Asadi and colleagues [39] demonstrated  
352 that the pre-treatment with *Salvia* species from Iran significantly protected neuron-like PC12 cells  
353 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity. *Rosmarinus officinalis* was effective in attenuating the disruption of  
354 mitochondrial membrane and cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in SH-SY5Y cells [40].

355 Bora and colleagues [13] demonstrated that pre-treatment with the extract of *Ocimum basilicum*  
356 reduces cerebral infarct size and LPO, restores glutathione content and attenuates impairment in  
357 short-term memory and motor coordination induced by global ischemia. *Ocimum sanctum* prevents  
358 oxidative stress during reperfusion and attenuates deficits on spatial learning and memory induced by  
359 hypoperfusion [14].

360 In the current report *O. americanum* extract demonstrated *in vitro* neuroprotective activity; the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
361 -induced decrease in mitochondrial activity that was totally reversed by the *Ocimum* extract in  
362 hippocampal slices from young rats but not from aged ones. It is important to note that deficiencies  
363 in the respiratory complex have been considered central to the underlying pathology of  
364 neurodegenerative conditions including stroke, Alzheimer's and Parkinson's diseases. Interestingly,  
365 the *O. americanum* extract was able to reduce the LDH released in hippocampal slices from young  
366 and aged rats. This result may be related to others findings here described, since both acute and  
367 chronic treatments reduced LPO (Fig. 1 and Fig. 4B). Acute administration of the DMSO  
368 significantly increased the LPO when compared to saline control group and the EEOA reduced this  
369 parameter to control levels. DMSO can exhibit a dual behavior, since it presents antioxidant and pro-

370 oxidants properties, the latter related at least in part with the reactivity of DMSO in oxidize the  
371 sulfhydryl group of some proteins [41]. Chronic administration of EEOA was able to decrease the  
372 LPO in 18-months-old rats. These findings are in agreement with those that describe the effect of  
373 *Ocimum* species preventing the LPO induced by ischemia/reperfusion and noise exposure [13,42].  
374 In accordance with our previous results, free radical content was significantly increased in  
375 hippocampus from 18-months-old rats [38], what seems to be critically involved in pathological  
376 alterations related with aging [43]. This is relevant, since we previously observed that the free radical  
377 levels and total antioxidant capacity were significantly altered in hippocampus from mature rats (6  
378 months) [11]. Accordingly, a dietary intake of a variety of antioxidants, like herbs and spices, might  
379 be beneficial for preserving brain function [34]. Chronic supplementation with EEOA for 4 weeks  
380 was able to reduce age-induced increase of free radicals levels, in contrast with its acute  
381 administration.

382 No changes were found on LPO in 18-months-old Wistar rat hippocampus. Accordingly, Kolosova  
383 and collaborators [44] did not find changes on LPO products, specifically Schiff bases, in 18-  
384 months-old Wistar rat hippocampus. These finding are in disagreement with our previous data [11],  
385 although those data were obtained with 20-months-old Wistar rat hippocampus.

386 It has been suggested that approaches to reduce the neuroinflammation parameters in aging process  
387 might be beneficial [45]. In this study, the chronic supplementation with EEOA modulated  
388 neuroinflammatory parameters in hippocampus from 3- and 18-months-old rats. It is important to  
389 note that 18-months-old rat hippocampus react to EEOA differently than those from 3-months-old  
390 rats. Some studies have reported increases on inflammatory markers during normal aging in the  
391 rodent hippocampus [46], although we did not find an increase in these markers in 18-months-old rat  
392 hippocampus. However, a great body of evidence has demonstrated that there are differential  
393 phenotypes of microglia in an age-dependent manner. When microglia in the young rat brain is  
394 activated, for example by TNF- $\alpha$ , there are an increase on anti-inflammatory cytokines including IL-

395 10 and transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), and this is considered a protective phenotype  
396 [47,48]. An example of harmful phenotype occurs when microglia is activated in brain of middle-  
397 aged rat, since these cells produce IL-1 $\beta$ , but less IL-10 and TGF- $\beta$ 1 [49]. EEOA was able to reduce  
398 the TNF- $\alpha$  content in 3- and 18-months-old rats, and as well as the levels of IL-1 $\beta$  in hippocampus  
399 from 3-months-old rats, but this result was modest in aged animals.

400 The memory enhancing effects of pre-treatment with different *Ocimum* species have been evaluated  
401 in ischemia and reperfusion models [13,14]. However, the effects of these species in improve  
402 memory performance in healthy animals with the perspective of prevention are still poorly studied.

403 The effect of acute treatment with EEOA on short-term memory was assessed in inhibitory  
404 avoidance task. We used the single-trial step-down inhibitory avoidance conditioning as an  
405 established model of aversive memory [24]. Nevertheless, EEOA, at tested doses, did not improve  
406 short-term aversive memory in this task.

407 In accordance, the acute treatment with EEOA and the chronic supplementation did not alter AChE  
408 activity in hippocampus. AChE inhibitors are used in symptomatic treatment of AD to ameliorate the  
409 cognitive impairment [50]; however, these inhibitors have many cholinergic side effects. According  
410 to our results, Sembulingam and colleagues [51] demonstrated that the administration of *Ocimum*  
411 *sanctum* extract for 7 days did not modify the AChE activity in several brain structures.

412 Nevertheless, this treatment prevents changes in AChE activities induced by exposure to noise stress.

413 Taken together, we can suppose that these species has adaptogenic properties, normalizing the steady  
414 state (homeostasis) against injury conditions. Considering that most of the works have reported *in*  
415 *vitro* anticholinesterase activities of species of the Lamicaeae family [15,16], our results indicate the  
416 need of studies investigating the effect of diet supplementation with herbs and spices.

417 At this point, neither the active compound(s) nor the exact mechanism(s) by which EEOA exerts its  
418 antioxidant activities are completely known. Although, it is fair to assume that the activities here

419 described for EEOA can be related at least in part to the presence of phenolic compounds such as  
420 rosmarinic acid, a natural antioxidant widespread in Lamiaceae [52].

421 The ethanol extract of *Ocimum americanum* contains neuroprotective compounds. We can propose  
422 that the antioxidant properties, preventing the lipoperoxidation, as well as anti-neuroinflammatory  
423 effect, might be related to neuroprotective effect. Nevertheless, more studies are needed to  
424 understanding the molecular mechanisms involved with its neuroprotective effect.

425

#### 426 **Acknowledgments**

427 This work was supported by the Brazilian funding agencies: CNPq (I.R. Siqueira, C. Vanzella, C.  
428 Spindler, A. Vizquete); Graduate Research Group (GPPG/FIPE) at Hospital de Clínicas de Porto  
429 Alegre (I.R. Siqueira—Grant # 09-638); CAPES (G.A. Lovatel; K. Bertoldi; F.S. Moysés).

430

#### 431 **References**

- 432 [1] Villeponteau B, Cockrell R, Feng J. Nutraceutical interventions may delay aging and the age-  
433 related diseases. *Exp Gerontol* 2000;35:1405-17.
- 434 [2] Eidi M, Eidi A, Bahar M. Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and  
435 its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition* 2006;22:321-26.
- 436 [3] Tildesley NTJ, Kennedy DO, Perry EK, Ballard CG, Savelev S, Wesnes KA, Scholey AB. *Salvia*  
437 *lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacol*  
438 *Biochem Behav* 2003;75:669–74.
- 439 [4] Perry N, Houghton, PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. *In vitro* inhibition of human erythrocyte  
440 acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Phar*  
441 *Pharm* 2000;52:895-902.

- 442 [5] Kennedy DO, Pace S, Haskell C, Okello EJ, Milne A, Scholey AB. Effects of cholinesterase  
443 inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor  
444 battery. *Neuropsychopharmacol* 2005;31:845-52.
- 445 [6] Kennedy DO, Scholey AB. The psychopharmacology of European herbs with cognition-  
446 enhancing properties. *Curr Pharm Des* 2006;12:4613-23.
- 447 [7] Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey  
448 AI, Chin LS, Li L. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer  
449 diseases. *J Biol Chem* 2006;281:10816–24.
- 450 [8] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;9:239-  
451 47.
- 452 [9] Gardner AM, Xu FH, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y, Lichtenstein A. Apoptotic versus  
453 nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radi Biol Med* 1997;22:73–83.
- 454 [10] Gorman AM, McGowan A, O’Neill C, Cotter T. Oxidative stress and apoptosis in  
455 neurodegeneration. *J Neurol Sci* 1996;139:45–52.
- 456 [11] Siqueira IR, Fochesatto C, Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A, Netto CA. Total  
457 antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci*  
458 2005;23:663–71.
- 459 [12] Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavljevic S, Trivic S. Antioxidant Capacity of *Ocimum basilicum*  
460 L. and *Origanum vulgare* L. Extracts. *Molecules* 2011;16:7401-14.
- 461 [13] Bora KS, Arora S, Shri R. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and  
462 reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. *J Ethnopharmacol*  
463 2011;137:1360–65.
- 464 [14] Yanpallewar SU, Rai S, Kumar M, Acharya SB. Evaluation of antioxidant and neuroprotetive  
465 effect of *Ocimum sanctum* on transient cerebral ischemia and long-term cerebral hypoperfusion.  
466 *Pharmacol Biochem Behav* 2004;79:155-64.

- 467 [15] Savelev S, Okello E, Perry NS, Wilkins RM, Perry EK. Synergistic and antagonistic interactions  
468 of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol Biochem*  
469 *Behav* 2003;75:661-8.
- 470 [16] Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Menichini F, Bonesi M, Nadjafi F, Frega NG, Menichini F.  
471 *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates *in vitro* antioxidant properties and  
472 cholinesterase inhibitory activity. *Nutr Res* 2010;30:823–30.
- 473 [17] Rogers J, Webster S, Lih-Fen L, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, Brenda S, Walker D,  
474 McGeer P. Inflammation and Alzheimer’s disease pathogenesis. *Neurobiol Aging* 1996;17:681–  
475 6.
- 476 [18] Colton CACON, Gilbert DI, Vitek MP. Microglial contribution to oxidative stress in  
477 Alzheimer’s disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:292–307.
- 478 [19] Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F.  
479 Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*  
480 1995;374:647–50.
- 481 [20] Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:278–94.
- 482 [21] Pickering M, O’Connor JJ. Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus.  
483 *Prog Brain Res* 2007;163:339–54.
- 484 [22] Paton A, Harley RM, Harley MM. *Ocimum*—an overview of relationships and classification. In:  
485 Holm Y, Hiltunen R, editors. *Basil, the genus Ocimum*. Medicinal and Aromatic Plants—  
486 Industrial Profiles. Amsterdam: Harwood Academic; 1999. p.1–38.
- 487 [23] Yucharoen R, Anuchapreeda S, Tragoolpua Y. Anti-herpes simplex virus activity of extracts  
488 from the culinary herbs *Ocimum sanctum* L., *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum americanum* L.  
489 *Afr J Biotechnol* 2011;5:860-6.

- 490 [24] Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the  
491 hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997;  
492 68:285–316.
- 493 [25] Quevedo J, Vianna MR, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, Izquierdo I. Protein  
494 synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in  
495 rats. *Behav Brain Res* 2004;154:339–43.
- 496 [26] Lebel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal induced increases in oxygen reactive  
497 species: the potential of 2,7-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage.  
498 *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;104:17–24.
- 499 [27] Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in  
500 brain by MPTP: *in vitro* and *in vivo* studies in mice. *Brain Res* 1997;749:44–52.
- 501 [28] Bromont C, Marie C, Bralet J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after  
502 transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1989;20:918–24.
- 503 [29] Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Feathstone RM. A new and rapid colorimetric  
504 determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-90.
- 505 [30] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of  
506 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- 507 [31] Posser T, Franco JL, Santos DA, Rigon AP, Farina M, Dafré AL, Rocha JBT, Leal RB.  
508 Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal  
509 slices. *Brain Res* 2008;1199:138–47.
- 510 [32] Mosmann T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to  
511 proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- 512 [33] Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in  
513 cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* 1987;20:83–90.



- 514 [34] Kolosova NG, Shcheglova TV, Sergeeva SV, Loskutova LV. Long-term antioxidant  
515 supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-  
516 accelerated OXYS rats. *Neurobiol Aging* 2006;27:1289-97.
- 517 [35] Juśkiewicz J, Zduńczyk Z, Jurgoński A, Brzuzan L, Godycka-Kłos I, Żary-Sikorska E. Extract  
518 of green tea leaves partially attenuates streptozotocin-induced changes in antioxidant status and  
519 gastrointestinal functioning in rats. *Nutr Res* 2008;28:343–49.
- 520 [36] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol  
521 reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- 522 [37] Joseph JA, Denisova JA, Bielinski D, Fisher DR, Shukitt-Hale B. Oxidative stress protection  
523 and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mech Ageing Dev*  
524 2000;116:141–53.
- 525 [38] Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Salbego C, Netto CA. Age-related susceptibility to  
526 oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. *Brain Res* 2004;1025:226–30.
- 527 [39] Asadi S, Ahmadiani A, Esmaeili MA, Sonboli A, Ansari N, Khodaghali F. *In vitro* antioxidant  
528 activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: A comparative  
529 study. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1341–9.
- 530 [40] Park SE, Kim S, Sapkota K, Kim SJ. Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on  
531 human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30:759–67.
- 532 [41] Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E. Antioxidant  
533 properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective  
534 antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011;63:209–15.
- 535 [42] Bora KS, Shri R, Monga J. Cerebroprotective effect of *Ocimum gratissimum* against focal  
536 ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharm Biol* 2011;49:175-81.

- 537 [43] Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. Cognitive impairment  
538 of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci*  
539 2002;959:275–84.
- 540 [44] Kolosova NG, Shcheglova TV, Amstislavskaya TG, Loskutova LV. Comparative analysis of  
541 LPO products in brain structures of Wistar and OXYS rats of different ages. *Bull Exp Biol Med*  
542 2003;6:593-96.
- 543 [45] Rich JB, Rasmusson DX, Folstein MF, Carson K, Kawas C, Brandt J. Nonsteroidal anti-  
544 inflammatory drugs in Alzheimer’s disease. *Neurol.* 1995;45:51–5.
- 545 [46] Gavilán MP, Revilla E, Pintado C, Castaño A, Vizuete ML, Moreno-González I, Baglietto-  
546 Vargas D, Sánchez-Varo R, Vitorica J, Gutiérrez A, Ruano D. Molecular and cellular  
547 characterization of the age-related neuroinflammatory processes occurring in normal rat  
548 hippocampus: potential relation with the loss of somatostatin GABAergic neurons. *J Neurochem*  
549 2007;103:984–96.
- 550 [47] Wu Z, Zhang J, Nakanishi H. Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce  
551 IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. *J*  
552 *Neuroimmunol* 2005;167:90–8.
- 553 [48] Wu Z, Hayashi Y, Zhang J, Nakanishi H. Involvement of PGE<sub>2</sub> released from leptomeningeal  
554 cells in increased expression of TGF-β1 in glial cells and cortical neurons during systemic  
555 inflammation. *J Neurosci Res* 2007;85:184–92.
- 556 [49] Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent responses of glial cells and  
557 leptomeninges during systemic inflammation. *Neurobiol Dis* 2008;32:543–51.
- 558 [50] Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S. Acetylcholinesterase inhibitors:  
559 novel activities of old molecules. *Pharmacol Res* 2004;50:441–51.

- 560 [51] Sembulingam K, Sembulingam P, Namasivayam A. Effect of *Ocimum sanctum* Linn on the  
561 changes in central cholinergic system induced by acute noise stress. J Ethnopharmacol  
562 2005;96:477-82.
- 563 [52] Rady MR, Nazif NM. Rosmarinic acid content and RAPD analysis of in vitro regenerated basil  
564 (*Ocimum americanum*) plants. Fitoterapia 2005;76:525–33.

## Legends

Figure 1. Effect of acute treatment with EEOA on LPO levels in hippocampus from young adult rats (3 months, n=5-7). Results are expressed as percentage of control (saline group) and analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey test. \*= values significantly different from saline group; #= values significantly different from DMSO group; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Figure 2. Effect of incubation with EEOA (0.1 and 1 µg/mL) on cellular viability in hippocampal slices submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evaluated by MTT assay. (A) young rats (3 months, n=6-8); (B) aged rats (16 months, n=6-8). Results were expressed as percentage of control group (0 µg/mL without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and analyzed by Two-way ANOVA followed by Tukey test. \*= values significantly different from control group; #= values significantly different from 0 µg/mL with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*p<0.05.

Figure 3. Effect of incubation with EEOA (0.1 and 1 µg/mL) on cellular damage in hippocampal slices submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evaluated by released of LDH (A) young rats (3 months, n=6-8); (B) aged rats (16 months, n=6-8). Results are expressed as percentage of control group (0 µg/mL without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and analyzed by Two-way ANOVA followed by Tukey test. \*= values significantly different from control group; #= values significantly different from 0 µg/mL with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*p<0.05.

Figure 4. Effect of EEOA supplementation on cellular oxidative state in the hippocampus from young (3 months) and aged rats (18 months). (A) DCF levels (n=5-7); (B) LPO levels (n=5-7). Results are expressed as percentage of control (young control group) and analyzed by Two-way ANOVA followed by Tukey test; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Figure 5. Effect of EEOA supplementation on neuroinflammatory parameters in the hippocampus from young (3 months) and aged rats (18 months). (A) TNF- $\alpha$  content (n=4-6); (B) IL-1 $\beta$  content (n=5-6). Results are expressed as percentage of control (young control group) and analyzed by Two-way ANOVA followed by Tukey test; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Figure 1

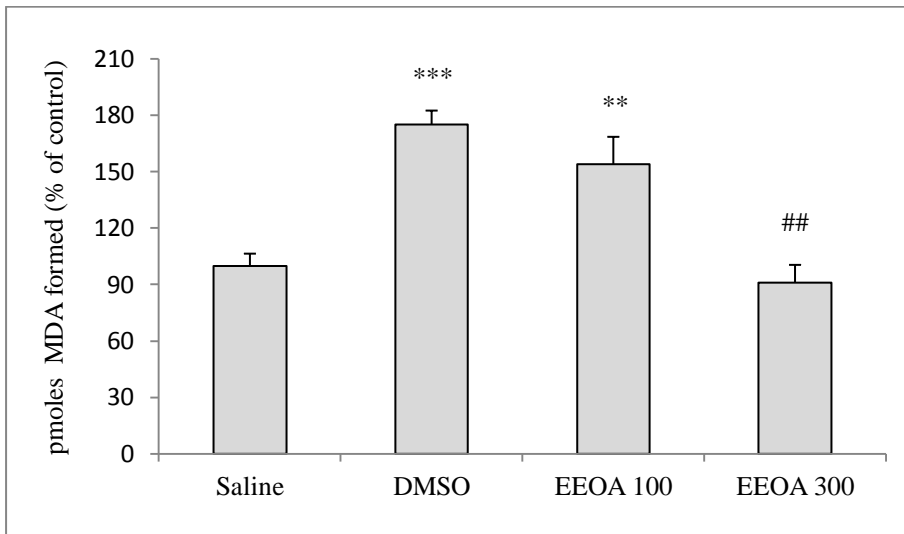


Figure 2A

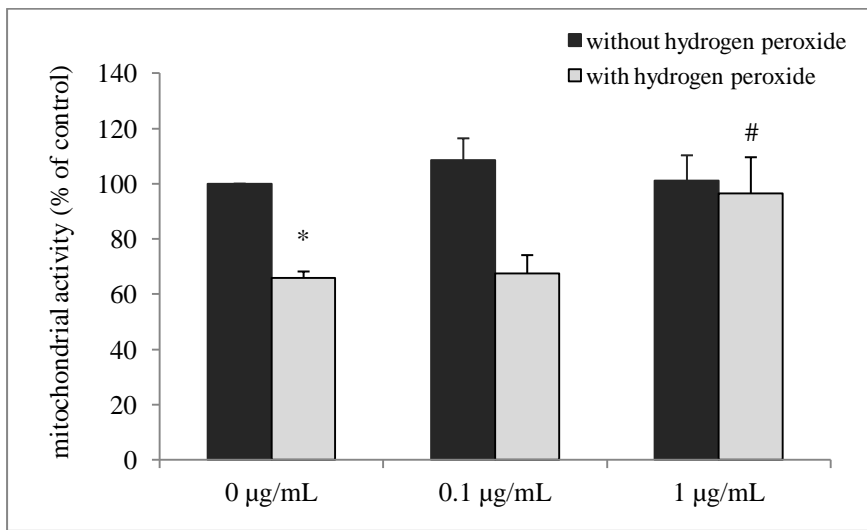


Figure 2B

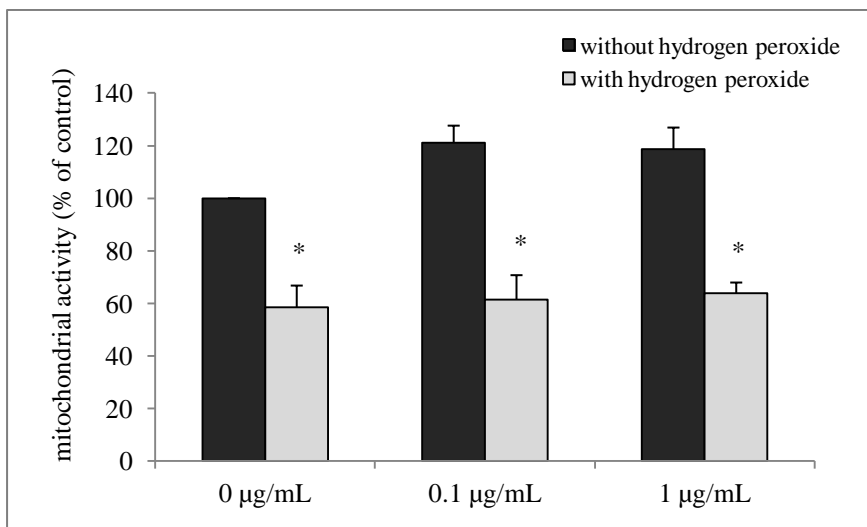


Figure 3A

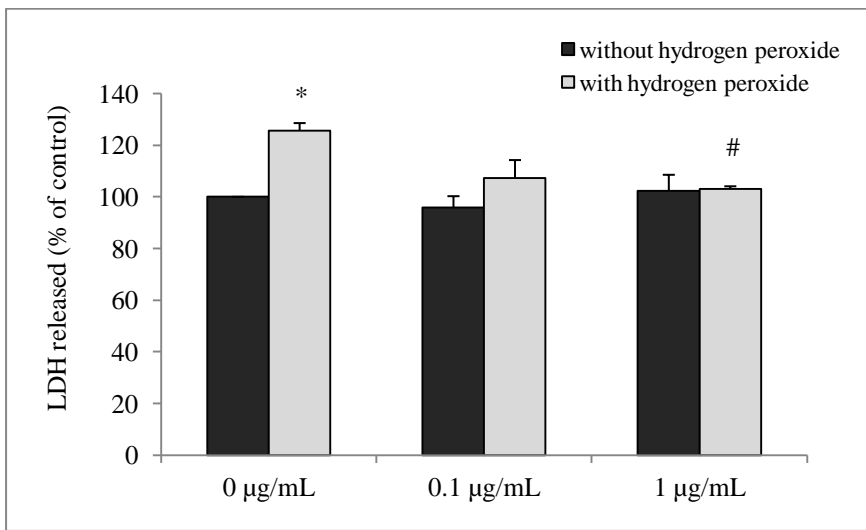


Figure 3B

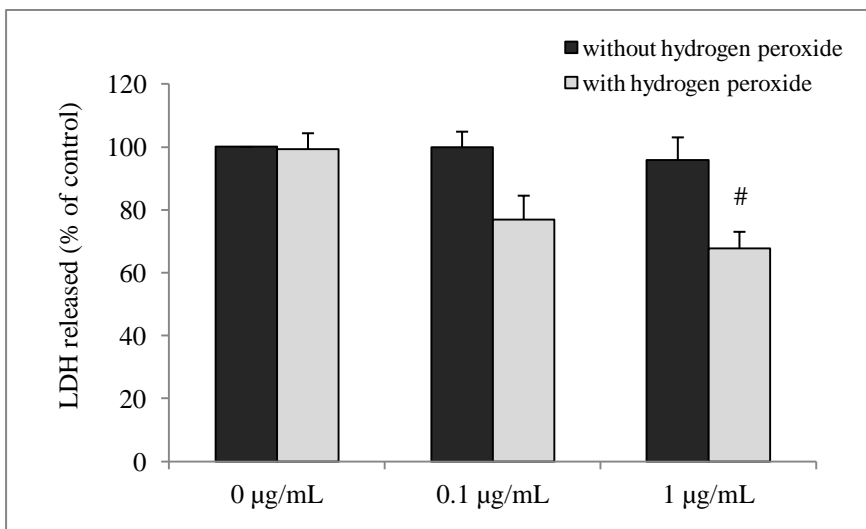




Figure 4A

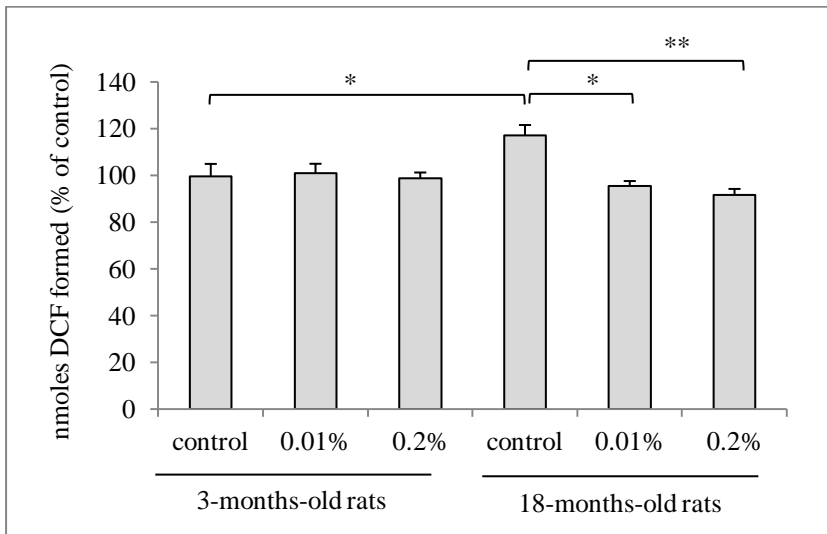


Figure 4B

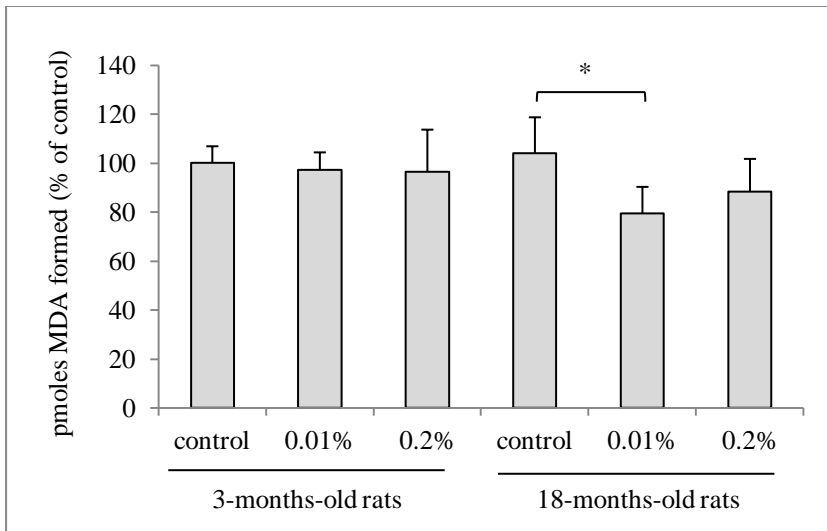


Figure 5A

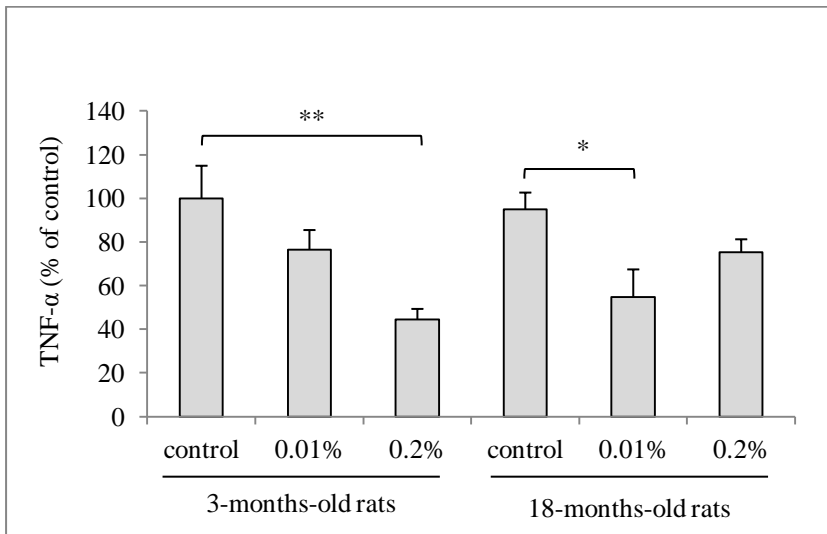


Figure 5B

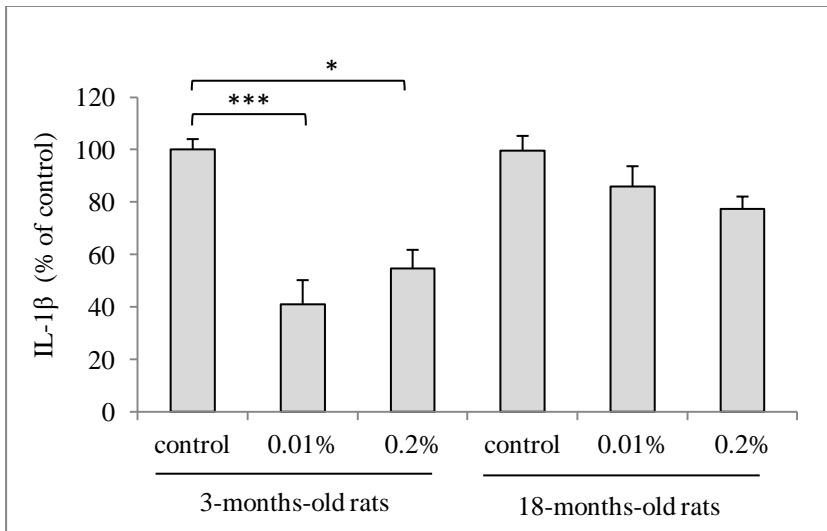


Table 1

Composition of experimental diets fed to rats (g/100g).

| <b>Composition</b> | <b>0% (Control)</b> | <b>0.01%</b> | <b>0.2%</b> |
|--------------------|---------------------|--------------|-------------|
| Total fat          | 11                  | 11           | 11          |
| Protein            | 22                  | 22           | 22          |
| Fiber              | 3                   | 3            | 3           |
| Ash                | 6                   | 6            | 6           |
| Vitamin            | 2                   | 2            | 2           |
| Carbohydrates      | 56                  | 56           | 56          |
| EEOA               | -                   | 0.01         | 0.2         |

Commercial non-purified diet from Nuvilab-CR1 (Curitiba, Brazil; caloric density

4.16 cal/g) supplemented with EEOA (0.01 and 0.2%).

### **PARTE III - DISCUSSÃO**

---

Nossos dados demonstram que o extrato etanólico de *Ocimum americanum* tem atividade antioxidante e modula alguns parâmetros neuroinflamatórios em cérebro de ratos, o que pode contribuir para sua ação neuroprotetora. É importante ressaltar que, a maioria dos estudos tem demonstrado as propriedades neuroprotetoras de espécies do gênero *Ocimum* em modelos animais de isquemia e reperfusão cerebral; contudo, nós investigamos os efeitos de *Ocimum americanum* em animais adultos jovens e envelhecidos, uma vez que as fatias hipocâmpais em diferentes idades podem responder de maneiras diferentes quando expostas ao dano oxidativo (Siqueira et al., 2005).

A incubação das fatias hipocâmpais de ratos de 3 e 16 meses de idade com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultou em mudanças marcantes na viabilidade celular (MTT). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem sido largamente utilizado como um indutor de estresse oxidativo em modelos *in vitro* (Satoh et al., 1996), especialmente em fatias hipocâmpais de roedores (Posser et al., 2008). Esta EROS pode induzir a apoptose em diferentes tipos celulares (Whittemore et al., 1995; Deng et al., 1999), e este efeito pode ser bloqueado pela adição de antioxidantes (Behl, 2000). A incubação com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou a liberação de LDH por fatias hipocâmpais de ratos de 3 meses de idade, mas não de ratos de 16 meses. Portanto, os resultados deste estudo indicam que as fatias hipocâmpais de ratos de envelhecidos podem responder à lesão induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de modo diferente que as de ratos jovens.

Vários estudos têm mostrado a ação neuroprotetora de espécies da família Lamiaceae contra o dano oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes tipos celulares. Asadi e colaboradores (2011) demonstraram que o pré-tratamento com seis espécies de *Salvia* do Irã protegeu significativamente as células com propriedades semelhantes aos neurônios (PC12) contra a toxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, *Rosmarinus officinalis* foi eficaz em atenuar a ruptura da membrana mitocondrial e a morte celular induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células SH-SY5Y (Park et al., 2010).

Outros estudos demonstraram que o pré-tratamento com o extrato de *Ocimum basilicum* reduziu o tamanho do infarto cerebral e a lipoperoxidação, restaurou o conteúdo de glutathiona e atenuou o prejuízo na memória de curta duração e na coordenação motora em camundongos (Bora et al., 2011a). Adicionalmente, *Ocimum sanctum* preveniu o estresse oxidativo durante a reperfusão e foi eficaz em atenuar os déficits de aprendizagem e memória espacial induzidos por hipoperfusão em ratos (Yanpallewar et al., 2004).

No presente estudo, *Ocimum americanum* apresentou atividade neuroprotetora *in vitro*, uma vez que houve uma reversão na redução da atividade mitocondrial induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fatias hipocâmpais de ratos de 3 meses de idade, mas não de ratos de 16 meses. É importante ressaltar que, as deficiências do complexo respiratório têm sido consideradas centrais para a patologia subjacente às condições neurodegenerativas, incluindo acidente vascular cerebral e as Doenças de Alzheimer e de Parkinson. O extrato de *Ocimum americanum* reverteu o dano na membrana plasmática induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fatias hipocâmpais de ratos de 3 meses de idade e reduziu a liberação de LDH nas fatias hipocâmpais de ratos de 16 meses. Este achado pode estar relacionado com outros resultados aqui descritos, uma vez que os tratamentos agudo e crônico reduziram a lipoperoxidação (Fig. 1 e Fig. 4B).

A administração aguda de dimetilsulfóxido (DMSO) aumentou significativamente a lipoperoxidação quando comparado com o grupo controle salina, e o extrato etanólico de *Ocimum americanum* reverteu o efeito do DMSO. Alguns trabalhos têm demonstrado que o DMSO pode exibir um comportamento dual, uma vez que apresenta atividade antioxidante, mas também propriedades pró-oxidantes que parecem estar relacionadas com a reatividade do DMSO em oxidar o grupo sulfidril de algumas proteínas (Sanmartín-Suárez et al., 2011). Observamos neste estudo que a administração

crônica do extrato etanólico de *Ocimum americanum* diminuiu a lipoperoxidação em ratos de 18 meses de idade. Neste contexto, tem sido demonstrado o efeito de espécies de *Ocimum* em reduzir a lipoperoxidação induzida por isquemia/reperfusão e pela exposição ao estresse por ruído (Bora et al., 2011a; Bora et al., 2011b).

De acordo com nossos resultados anteriores, o conteúdo de radicais livres foi significativamente maior no hipocampo de ratos de 18 meses de idade (Siqueira et al., 2005), o que parece estar criticamente envolvido com as alterações patológicas relacionadas com o envelhecimento (Fukui et al., 2002). Isso é relevante, uma vez que observamos anteriormente que os níveis de radicais livres e a capacidade antioxidante total foram alterados em hipocampo de ratos maduros (6 meses) (Siqueira et al., 2005). Assim, pode-se sugerir que a ingestão de uma variedade de antioxidantes, como condimentos e especiarias, pode ser benéfica para preservar a função cerebral (Kolossova et al., 2006). Consistentemente, a suplementação crônica com o extrato etanólico de *Ocimum americanum* reduziu o aumento dos níveis de radicais livres induzido pela idade, em contraste com a sua administração aguda.

Não encontramos alterações na lipoperoxidação em hipocampo de ratos Wistar de 18 meses de idade. De acordo com nossos resultados, Kolossova e colaboradores (2003) não encontraram alterações nos produtos de lipoperoxidação, especificamente nas bases de Schiff, em hipocampo de ratos Wistar de 18 meses de idade. Estes achados estão em desacordo com os nossos dados anteriores (Siqueira et al., 2005), contudo tais dados foram obtidos com hipocampo de ratos Wistar de 20 meses de idade.

Vários trabalhos têm reportado que abordagens que visem reduzir os parâmetros de neuroinflamação no processo de envelhecimento podem ser benéficas (Rich et al., 1995). Nós demonstramos que a suplementação crônica com extrato etanólico de

*Ocimum americanum* modulou parâmetros neuroinflamatórios em hipocampo de ratos de 3 e 18 meses de idade.

Alguns estudos têm mostrado o aumento em marcadores inflamatórios em hipocampo de roedores durante o envelhecimento normal (Gavilán et al., 2007), contudo não encontramos um aumento no conteúdo das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em hipocampo de ratos Wistar de 18 meses de idade. De acordo com nossos achados, Chen e colaboradores (2008) não observaram diferença significativa na expressão de TNF- $\alpha$  em hipocampo de camundongos BALB/c jovens e envelhecidos. Além disso, Barrientos e colaboradores (2009) não encontraram alterações nos níveis de IL-1 $\beta$  em hipocampo de ratos envelhecidos quando comparado aos jovens. Várias evidências têm demonstrado que existem fenótipos diferenciais de microglia de forma dependente da idade. Quando a microglia no cérebro de ratos jovens é ativada, por exemplo pelo TNF- $\alpha$ , há um aumento nas citocinas anti-inflamatórias incluindo IL-10 e o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1), sendo este um fenótipo de proteção (Wu et al., 2005; Wu et al., 2007). Um exemplo de fenótipo prejudicial ocorre quando há a ativação da microglia em ratos de meia-idade, pois estas células produzem IL-1 $\beta$ , mas menos IL-10 e TGF- $\beta$ 1 (Wu et al., 2008). Os nossos dados demonstraram que a suplementação crônica com extrato etanólico de *Ocimum americanum* reduziu o conteúdo de TNF- $\alpha$  em hipocampo de ratos de 3 e 18 meses de idade. Além disso, esta suplementação diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  em hipocampo de ratos de 3 meses de idade, mas este resultado foi modesto em ratos de 18 meses.

Considerando que o pré-tratamento com diferentes espécies de *Ocimum* tem demonstrado efeitos relevantes na melhora da memória, o efeito do tratamento agudo com o extrato etanólico de *Ocimum americanum* sobre a memória aversiva de curta duração foi avaliado na tarefa de esquiava inibitória; no entanto, nossos dados revelaram



que o extrato de *Ocimum*, nas doses testadas, não alterou a memória de curta duração nesta tarefa. Em estudo prévio demonstramos que a suplementação de camundongos machos adultos com o extrato etanólico de *Ocimum americanum* durante 15 dias melhorou a memória espacial avaliada através do T-maze (Vanzella et al., 2007). De acordo com nosso estudo prévio, Yanpallewar e colaboradores (2004) reportaram que o pré-tratamento durante 7 dias com extrato padronizado de *Ocimum sanctum* reduziu os déficits na memória espacial induzidos por isquemia e hipoperfusão cerebral em ratos. Esses dados são relevantes pois demonstram que as espécies de *Ocimum* parecem ser mais efetivas em melhorar a memória espacial em roedores, e também reforçam a importância dessas espécies como condimento, uma vez que a suplementação durante 15 dias melhorou a memória em camundongos em contraste com a sua administração aguda.

Neste estudo, não encontramos diferenças na atividade da AChE entre ratos de 3 e 18 meses de idade. De acordo com nossos resultados, Das, Dikshit e Nath (2001) demonstraram que a redução na atividade da AChE no hipocampo de ratos envelhecidos foi menor que aquela observada em outras estruturas cerebrais, e sugeriu que isto pode estar relacionado ao fato de que a AChE no hipocampo é relativamente resistente às alterações ligadas à idade. Em estudo prévio demonstramos que o extrato etanólico de *Ocimum americanum* inibiu a atividade *in vitro* da AChE no córtex frontal e no hipocampo de camundongos (Vanzella et al., 2006). O tratamento agudo e a suplementação crônica com o extrato etanólico de *Ocimum americanum* não modificaram a atividade da AChE no hipocampo. De acordo com este achado, Sembulingam e colaboradores (2005) demonstraram que a administração do extrato de *Ocimum sanctum* por 7 dias não alterou a atividade da AChE em várias estruturas cerebrais. No entanto, este tratamento impediu as alterações na atividade da AChE

induzidas pela exposição ao estresse por ruído. Alguns pesquisadores têm sugerido que algumas espécies de *Ocimum*, em especial o *Ocimum sanctum*, alteram parâmetros bioquímicos quando há perda da homeostase e por isso tem uma ação adaptogênica (Sembulingam et al., 1997, 1998, 1999). Além de que, deve-se considerar que grande parte dos estudos de atividade anticolinesterásica de espécies da família Lamiaceae foram realizados utilizando ensaios *in vitro*, assim, em ensaios *in vivo* os resultados podem não reproduzir graças a processos farmacocinéticos, como absorção, distribuição e eliminação.

Até o momento, o composto ativo e o mecanismo através do qual o EEOA exerce suas ações não são completamente conhecidos. Contudo, é razoável assumir que as atividades descritas para o EEOA neste trabalho possam estar relacionadas pelo menos em parte com a presença de compostos fenólicos, tais como o ácido rosmarínico, um antioxidante muito encontrado em espécies da família Lamiaceae (Rady e Nazif, 2005). Ainda, cabe ressaltar que o nosso objetivo aqui foi avaliar o efeito da planta com vistas à nutracêutica, já que ela é muito utilizada como condimento.

Os dados deste estudo sugerem que o extrato etanólico de *Ocimum americanum* contém compostos neuroprotetores. Podemos propor que as propriedades antioxidantes, bem como a modulação do processo de neuroinflamação, podem estar relacionadas com o efeito neuroprotetor. No entanto, mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com este efeito neuroprotetor.

## **PARTE IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neurosci* 2004;10:18–25.

Aruoma OI, Spencer JP, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N, Munoz A, Murcia A, Butler J, Halliwell B. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs. *Food Chem Toxicol* 1996;34:449-56.

Asadi S, Ahmadiani A, Esmaeili MA, Sonboli A, Ansari N, Khodaghali F. *In vitro* antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: A comparative study. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1341–9.

Barrientos RM, Frank MG, Hein AM, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Time course of hippocampal IL-1 $\beta$  and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain Behav Immun* 2009;23:46–54.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;2:548-71.

Behl C. Vitamin E protects neurons against oxidative cell death *in vitro* more effectively than 17-beta estradiol and induces the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J Neural Transm* 2000;107:393–407.

Bickford PA, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, Young D, Shukitt-Hale B, Joseph J. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res* 2000;866:211–7.

Bilbo SD. Early-life infection is a vulnerability factor for aging-related glial alterations and cognitive decline. *Neurobiol Learn Mem* 2010;94:57–64.

Bora KS, Arora S, Shri R. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. J Ethnopharmacol 2011a; 137:1360–5.

Bora KS, Shri R, Monga J. Cerebroprotective effect of *Ocimum gratissimum* against focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. Pharm Biol 2011b;49:175-81.

Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. Brain Behav Immun 2008; 22:301–11.

Das A, Dikshit M, Nath C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. Life Sci 2001;68:1545-55.

Deng GM, Su JH, Ivins KJ, Van Houten V, Cotman CW. Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. Exp Neurol 1999;159:309–18.

Eidi M, Eidi A, Bahar M. Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. Nutrition 2006;22:321-6.

Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. Rev Bras Reumatol 2008;48:17-24.

Forlenza, O. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. Rev Psiquiatr Clín 2005;32:137-48.

Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:275–84.

Gavilán MP, Revilla E, Pintado C, Castaño A, Vizuete ML, Moreno-González I, Baglietto-Vargas D, Sánchez-Varo R, Vitorica J, Gutiérrez A, Ruano D. Molecular and cellular characterization of the age-related neuroinflammatory processes occurring in normal rat hippocampus: potential relation with the loss of somatostatin GABAergic neurons. *J Neurochem* 2007;103:984–96.

Halliwell B, G. Free radicals in biology and medicine. 4.ed. New York: Oxford University Press, 2007.23.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298–300.

IBGE. Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade - 1980-2050. 2008; 24:1-94.

Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 2003;51:4442–9.

Jurgens HA, Johnson RW. Dysregulated neuronal–microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol* 2012;233:40-8.

Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavljevic S, Trivic S. Antioxidant Capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. Extracts. *Molecules* 2011;16:7401-14.

Kolosova NG, Shcheglova TV, Amstislavskaya TG, Loskutova LV. Comparative analysis of LPO products in brain structures of Wistar and OXYS rats of different ages. *Bull Exp Biol Med* 2003;6:593-96.

Kolossova NG, Shcheglova TV, Sergeeva SV, Loskutova LV. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. *Neurobiol Aging* 2006;27:1289-97.

Loizzo MR, Menichini F, Conforti F, Tundis R, Bonesi M, Saab AM, et al. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chem* 2009;117:174-80.

Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Menichini F, Bonesi M, Nadjafi F, Frega NG, Menichini F. *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates *in vitro* antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity. *Nutr Res* 2010;30:823–30.

Madsen HL, Sorensen B, Skibsted, L, Bertelsen G. The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness. *Food Chem* 1998;63:173-80.

Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:278–94.

Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti GA, et al. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chem* 2009;114:553-60.

Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *J Agric Food Chem* 2002;50:1845-51.

Moss M, Cook J, Wesnes K, Duckett P. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *Int J Neurosci* 2003;113:15–38.

Nakanishi H, Wu Z. Microglia-aging: Roles of microglial lysosome- and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging. *Behav Brain Res* 2009;201:1–7.

Okamura N, Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochem* 1994;37:1463-66.

Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochem* 2007;72:132-45.

Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Mitochondrial dysfunction in brain aging: Role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochem Int* 2011;58: 447–57.

Park SE, Kim S, Sapkota K, Kim SJ. Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30:759–67.

Paton A, Harley RM, Harley MM. *Ocimum*—an overview of relationships and classification. In: Holm Y, Hiltunen R, editors. *Basil, the genus Ocimum*. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles. Amsterdam: Harwood Academic; 1999. p.1–38.

Perry N, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:895-902.



Posser T, Franco JL, Santos DA, Rigon AP, Farina M, Dafré AL, Rocha JBT, Leal RB. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Res* 2008;1199:138–47.

Rady MR, Nazif NM. Rosmarinic acid content and RAPD analysis of *in vitro* regenerated basil (*Ocimum americanum*) plants. *Fitoterapia* 2005;76:525–33.

Rich JB, Rasmusson DX, Folstein MF, Carson K, Kawas C, Brandt J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurol.* 1995;45:51–5.

Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011;63:209–15.

Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade P, Fernandes-Ferreira M. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci* 2002;162:981-7.

Sanz N, Diez-Fernandez C, Alvarez A, Cascales M. Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* 1997;27:524–34.

Satoh I, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H. Free radical independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide triggered-apoptosis. *J Biochem* 1996;120:540–6.

Sembulingam K, Sembulingam P, Namasivayam A. Effect of *Ocimum sanctum* Linn on noise induced changes in plasma corticosterone. *Indian J Physiol Pharmacol* 1997;41:139–43.

Sembulingam K, Sembulingam P, Namasivayam A. Antistressor effect of *Ocimum sanctum* Linn on changes in organ weight of albino rats induced by acute noise stress. *Biomedicine* 1998;18:31–5.

Sembulingam K, Sembulingam P, Namasivayam A. Effect of *Ocimum sanctum* Linn on noise induced changes in leukocytes of albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1999;43:137–40.

Sembulingam K, Sembulingam P, Namasivayam A. Effect of *Ocimum sanctum* Linn on the changes in central cholinergic system induced by acute noise stress. *J Ethnopharmacol* 2005;96:477-82.

Siqueira IR, Fochesatto C, Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A, Netto CA. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci* 2005;23:663–71.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996;273:59-63.

Sohal RS. Oxidative stress hypothesis of aging. *Free Rad Biol Med* 2002;5:573–4.

Tildesley NTJ, Kennedy DO, Perry EK, Ballard CG, Savelev S, Wesnes KA, Scholey AB. *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;75:669–74.

Vanzella C, Ely JC, Fochesatto C, Netto CA, Marchi MI, Ethur EM, Siqueira IR. Atividade antioxidante *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 15, 2003, Porto Alegre. Anais do XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p 97.

Vanzella C, Ely JC, Ethur EM, Marchi MI, Fochesatto C, Netto CA, Siqueira IR. Atividade antioxidante *in vivo* de *Ocimum selloi* Benth. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVATES, 3, 2004, Lajeado. Anais do III Salão de Iniciação Científica da UNIVATES. Lajeado: Univates, 2004. p 40.

Vanzella C, Bianchetti P, Vanzin SI, Sbaraini S, Eckert MA, Scheid T, Ethur EM, Netto CA, Siqueira IR. Atividade anticolinesterásica *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 18, 2006, Porto Alegre. Anais do XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Porto Alegre: UFRGS, 2006. p 61.

Vanzella C, Bianchetti P, Sbaraini S, Ethur EM, Netto CA, Siqueira IR. Efeitos do extrato etanólico de *Ocimum selloi* Benth. em camundongos: propriedades relevantes ao tratamento da Doença de Alzheimer. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 19, 2007, Porto Alegre. Anais do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p 630.

Viegas CJr, Bolzani VS, Furlan M, Fraga CAM, Barreiro EJ. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. Quim Nova 2004;4:655-60.

Vieira RF, Grayer RJ, Paton AJ. Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids. Phytochem 2003;63:555-67.

Villeponteau B, Cockrell R, Feng J. Nutraceutical interventions may delay aging and the age-related diseases. Exp Gerontol 2000;35:1405-17.

Whittemore ER, Loo DT, Watt JA, Cotman CW. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. Neurosci 1995;67:921-32.

Wilson CJ, Finch CE, Cohen HJ. Cytokines and cognition—the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:2041–56.

Wu Z, Zhang J, Nakanishi H. Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. *J Neuroimmunol* 2005;167:90–8.

Wu Z, Hayashi Y, Zhang J, Nakanishi H. Involvement of PGE<sub>2</sub> released from leptomeningeal cells in increased expression of TGF-β1 in glial cells and cortical neurons during systemic inflammation. *J Neurosci Res* 2007;85:184–92.

Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent responses of glial cells and leptomeninges during systemic inflammation. *Neurobiol Dis* 2008; 32:543–51.

Yanpallewar SU, Rai S, Kumar M, Acharya SB. Evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of *Ocimum sanctum* on transient cerebral ischemia and long-term cerebral hypoperfusion. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;79:155-64.