**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

NATÁLIA CHERMONT DOS SANTOS MOREIRA

**DIFERENCIAÇÃO NEURONAL E EFEITO NEUROPROTETOR DE NOVAS MOLÉCULAS
HÍBRIDAS INIBIDORAS DE ACETILCOLINESTERASE EM MODELO SH-SY5Y**

Ribeirão Preto

2019

NATÁLIA CHERMONT DOS SANTOS MOREIRA

**DIFERENCIAÇÃO NEURONAL E EFEITO NEUROPROTETOR DE NOVAS MOLÉCULAS
HÍBRIDAS INIBIDORAS DE ACETILCOLINESTERASE EM MODELO SH-SY5Y**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto
Hojo

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Natália Chermont dos Santos

Diferenciação neuronal e efeito neuroprotetor de novas moléculas híbridas inibidoras de acetilcolinesterase em modelo SH-SY5Y / Ribeirão Preto, 2019. 97f.

97f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP.
Área de concentração: Genética. Orientadora *Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi*.

1. Doença de Alzheimer;
2. Neurodiferenciação;
3. Neuroproteção;
4. Estresse oxidativo;
5. Inibidores de AChE.

Nome: MOREIRA, Natália Chermont dos Santos

Título: Diferenciação neuronal e efeito neuroprotetor de novas moléculas híbridas inibidoras de acetilcolinesterase em modelo SH-SY5Y

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. Nº 2017/15123-1).

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP-USP.

Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FFCLRP-USP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pelo crédito e confiança depositados, pela orientação neste trabalho e por toda a compreensão, apoio e colaboração para o meu amadurecimento. Muito Obrigada!

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi** pelo carinho e amizade, pelo apoio e palavra amiga, muito obrigada por sempre proporcionar momentos de descontração e alegria dentro do laboratório.

À **Profa. Dra. Ivone Carvalho** e a **Dra. Talita Perez Cantuaria Chierrito** pela colaboração e por terem cedido gentilmente os compostos avaliados nesse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo Silva Passos Junior** pela simpatia e por permitir a utilização de equipamentos de seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP.

À **Profa. Dra. Ester Silveira Ramos**, coordenadora do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da FMRP-USP pelo apoio e dedicação à pós-graduação.

Às funcionárias do Departamento de Genética da FMRP-USP, **Maria Oliveira**, **Susie A. Nalon** e **Gustavo Medeiros**, pela atenção e apoio prestados.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Agradeço ao **Departamento de Genética** e à **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** pela estrutura oferecida para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço a **FAPESP** pela bolsa de Mestrado oferecida para realização desse projeto e todo o suporte financeiro.

Ao **CNPq**, **CAPES** e **FAEPA** pelo apoio financeiro dado a esse projeto.

Ao **Luiz Augusto da Costa Junior** pela amizade, carinho, atenção e pelos grandes e bons conselhos sempre que precisei. Muito Obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese: **Jéssica Ellen, Danilo Jordão**, pela amizade incrível e todos os momentos maravilhosos que passei com vocês dois, mesmo ficando até meia noite no laboratório! À **Ana Paula**, pelos conselhos, pela imensa ajuda tanto no desenvolvimento desse trabalho, como ensinamentos que levarei para a vida toda. À **Mércia Ferreira, Larissa Piassi, Ana Beatriz, Thayna Flores, Sarah Lima** e ao **Paulo Godoy** muito obrigada pela amizade, pelas risadas e carinho, por sempre estarem à disposição para ajudar. Muito Obrigada a todos!

Aos colegas do laboratório de Bioinformática, **Gabriel Monteiro da Silva** e **Elvira Tamarozzi** pela amizade e consideração.

Aos meus amigos do coração **Thatiane Clara** e **Gustavo Gontijo** por mesmo longe sempre estarem ao meu lado e torcendo por mim. Obrigada!

À minha família, minha mãe **Maria**, meu pai **Vanderval** e ao meu irmão **Breno Rafael**, muito obrigada por todo o apoio e por acreditarem em mim.

À minha sogra **Vânia Izidoro** por acreditar e me apoiar sempre, por me ajudar a estar aqui hoje. Obrigada!

Ao meu namorado **Eduardo Izidoro** por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos bons e difíceis, por sempre me apoiar e acreditar no meu sucesso, pela palavra amiga e companheira e pelo abraço aconchegante sempre que precisei. Muito Obrigada meu Amor!

RESUMO

MOREIRA, N. C. S. **Diferenciação neuronal e efeito neuroprotetor de novas moléculas híbridas inibidoras de acetilcolinesterase em modelo SH-SY5Y.** 2019, 97f, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela perda progressiva de memória episódica relacionada à agregação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e à fosforilação anormal da proteína tau, levando à perda da função colinérgica. É bem conhecido que o comprometimento desta função devido à neurotoxicidade do peptídeo $A\beta$ contribui significativamente para o declínio cognitivo associado à DA. Os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) compõem a principal classe de drogas usadas no tratamento da DA. No entanto, há uma grande necessidade de síntese de novas moléculas, uma vez que os fármacos já em uso pelos pacientes apresentam alta toxicidade hepática, além de vários efeitos colaterais devido à ação nos tecidos periféricos. A hipótese do presente projeto se baseia na atividade de indução de neurodiferenciação e neuritogênese de novos compostos inibidores de AChE, os quais são híbridos sintéticos de donepezila-tacrina, além de atuarem como neuroprotetores em culturas de células neuronais, sob condições experimentais de um estímulo neurotóxico e de estresse oxidativo induzidos pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de neurodiferenciação e neuritogênese, assim como o potencial neuroprotetor de duas moléculas híbridas de donepezila-tacrina na linhagem SH-SY5Y, modelo de diferenciação neuronal. Foram realizados ensaios de citotoxicidade e hepatotoxicidade em células tratadas e coletadas em diferentes tempos (24, 48, 72 e 120 h) nas linhagens celulares SH-SY5Y e HepG2, respectivamente. Ensaios de diferenciação neuronal (análise morfológica), expressão proteica, cinética ciclo celular, proliferação celular, alterações mitocondriais e de estresse oxidativo foram realizados em linhagem neuronal SH-SY5Y. Ainda, foram realizados ensaios de viabilidade e morte celular para avaliar a capacidade de neuroproteção dos novos compostos híbridos na linhagem SH-SY5Y. Estes não se mostraram citotóxicos e não alteraram a viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas: TA8Amino 0,0035 a 0,112 μ M e TAHB3 0,088 a 2,84 μ M; nos ensaios de hepatotoxicidade, o composto TAHB3 reduziu a viabilidade celular na maior concentração (2,84 μ M) e no tempo de 24 h. Ambos os compostos híbridos foram capazes de induzir diferenciação neuronal e neuritogênese, cerca de 55% das células para TA8Amino e 43% para TAHB3. Apenas o composto TA8Amino induziu um aumento de aproximadamente 75% na expressão do marcador β -III-Tubulina comprovando a formação de neurônios maduros. Nenhum dos tratamentos realizados causaram alterações significativas na distribuição das células nas fases do ciclo celular e no ensaio de proliferação celular. O composto TA8Amino foi capaz de induzir a produção de ROS intracelular (48,27%) e mitocondrial (67,60%) nas células diferenciadas. Ambos os compostos híbridos aumentaram a expressão de SOD1, indicando atuação na atividade antioxidante das células. Entretanto, os compostos não alteraram o potencial de membrana mitocondrial e massa mitocondrial. Esses dados demonstram que o estresse oxidativo induzido pelo TA8Amino não gerou danos por disfunção mitocondrial nas células diferenciadas. Na avaliação de alterações da expressão proteica de PTEN_(Ser380/Thr382/383), AKT_(Ser473) e COX2 ambos os compostos híbridos promoveram a indução de PTEN e AKT. TA8Amino e TAHB3 induziram um aumento na expressão de COX2 demonstrando uma

possível atuação na via de sinalização PI3K/AKT/COX2, compatível com a diferenciação neuronal. Nos ensaios de viabilidade celular, os compostos TA8amino e TAHB3 apresentaram efeito de neuroproteção frente ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$, promovendo uma proteção de 91,93% para TA8Amino e 54,68% para TAHB3, embora o mesmo efeito não tenha sido observado nas células tratadas com o peróxido de hidrogênio. Entretanto, a indução de morte por apoptose pelas moléculas híbridas nas células tratadas com o peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ foi apenas levemente alterada pelos compostos, havendo uma redução de 5,10 e 4,85%, respectivamente, para TA8Amino e TAHB3. Em geral, os resultados do presente trabalho demonstraram que os compostos híbridos donepezilacrina (TA8amino e TAHB3), inibidores da AChE, apresentam vantagens como potenciais fármacos, visto não serem citotóxicos nas concentrações de inibição da enzima AChE, além de serem capazes de induzir diferenciação neuronal, neuritogênese e neuroproteção, diferentemente dos fármacos donepezila e tacrina, testados isoladamente.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; neurodiferenciação; neuroproteção; estresse oxidativo; inibidores de AChE.

ABSTRACT

MOREIRA, N. C. S. **Neuronal differentiation and neuroprotective effect of new hybrid acetylcholinesterase inhibitors molecules in SH-SY5Y model.** 2019, 97f, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive loss of episodic memory related to aggregation of β -amyloid peptide ($A\beta$) and to abnormal phosphorylation of tau protein, leading to loss of cholinergic function. It is well known that the impairment of this function due to $A\beta$ peptide neurotoxicity contributes significantly to the cognitive decline associated with AD. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors are the main class of drugs used to treat AD. However, there is a great need for synthesis of new molecules, since current drug treatment presents high hepatic toxicity, besides several side effects due to the action in the peripheral tissues. The hypothesis of this project is based on the activity of AChE inhibitor compounds (synthetic hybrids of donepezil-tacrine) in terms of inducing neurodifferentiation and neuritogenesis, as well as neuroprotective effects in neuronal cells under experimental conditions of a neurotoxic stimulus and oxidative stress induced by the peptide $A\beta_{(1-42)}$ and hydrogen peroxide (H_2O_2). Thus, the objective of this work was to evaluate the neurodifferentiation and neuritogenesis abilities, as well as the neuroprotective potential of two hybrid molecules of donepezil-tacrine in the SH-SY5Y model. Cytotoxicity and hepatotoxicity assays were performed on treated cells that were collected at different times (24, 48, 72 and 120 h) in SH-SY5Y and HepG2 cell lines, respectively. Neuronal differentiation assays (morphological analysis), protein expression, cell cycle kinetics, cell proliferation, mitochondrial changes and oxidative stress were performed on SH-SY5Y cell line. Further, viability and cell death assays were performed to evaluate the neuroprotection ability of the novel hybrid compounds in SH-SY5Y cells. The compounds did not present cytotoxic effects and did not alter cell viability at the following concentrations: TA8Amino 0.0035 to 0.112 μ M and TAHB3 0.088 to 2.84 μ M; in the hepatotoxicity assays, TAHB3 reduced cell viability only at the highest concentration (2.84 μ M) and at the time of 24 h. Both hybrid compounds were able to induce neuronal differentiation and neuritogenesis, around 55% after TA8Amino and 43% after TAHB3 treatment. Only TA8Amino induced approximately 75% increase in β -III-Tubulin expression, compatible with the formation of mature neurons. None of the treatments performed caused significant changes in cell cycle kinetics. The synthetic hybrid TA8Amino induced the production of intracellular (48.27%) and mitochondrial ROS (67.60%). Both hybrid compounds increased SOD1 expression, which could be related to the increase of oxidative damage. However, both TA8amino and TAHB3 did not promote changes in mitochondrial membrane and mitochondrial mass potential. This data demonstrate that oxidative stress induced by TA8Amino did not generate damage due to mitochondrial dysfunction in differentiated cells. In the evaluation of changes in PTEN_(Ser380/Thr382/383), AKT_(Ser473) and COX2 protein expression, both hybrid compounds were able to induce PTEN and AKT expression. TA8Amino and TAHB3 promoted an increase in COX2

expression indicating a possible role in the PI3K/AKT/COX2 pathway, which is related to neuronal differentiation. In the cell viability assays, TA8amino and TAHB3 showed a neuroprotective effect against the neurotoxic damage induced by the A β peptide (1-42), promoting a protection of 91.93% for TA8Amino and 54.68% for TAHB3, although the same effect could not be observed in cells treated with hydrogen peroxide. However, the induction of apoptosis by the hybrid molecules in cells treated with the A β ₍₁₋₄₂₎ peptide was only slightly altered by the compounds, with a reduction of 5.10 and 4.85%, respectively, for TA8Amino and TAHB3, respectively. In general, the results of the present work demonstrate that donepezil-tacrine hybrid compounds (TA8amino e TAHB3), AChE inhibitors, have advantages as potential drugs, since they are not cytotoxic at concentration levels that inhibit AChE enzyme, besides being able to induce neuronal differentiation, neuritogenesis and neuroprotection, unlike the drugs donepezil and tacrine, tested alone.

Keywords: Alzheimer's disease; neurodifferentiation; neuroprotection; oxidative stress; inhibitors of AChE.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento da DA (Chierrito, 2016).24
- Figura 2:** Estratégia de hibridação molecular, envolvendo os fármacos donepezila e tacrina para obtenção do híbrido, capaz de interagir nos sítios ativo (PAS) e periférico (CAS), da AChE como *dual binding site* (Chierrito, 2016).26
- Figura 3:** Células SH-SY5Y diferenciadas mostrando dois tipos morfológicamente distintos: “S” e “N”. Célula do tipo “N” é mais semelhante a um neurônio, com corpos em forma de pirâmide e neuritos longos (indicados pelas setas). Células do tipo “S” epitelial, sem neuritos (indicados pelos asteriscos).32
- Figura 4:** Via de indução de diferenciação neuronal pelo ácido retinoico a partir da ligação aos receptores de ácido retinoico (RAR/RXR). Baseado em Roy Choudhury e colaboradores (2012) e Maden (2007).34
- Figura 5:** Protocolo de neurodiferenciação da linhagem celular SH-SY5Y. No dia -1, as células foram plaqueadas e cultivadas em meio de células contendo 10% de SBF. Após 24 h (dia 0), o meio de cultivo foi removido e adicionado novo meio de tratamento (MT) contendo 1% de SBF e dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M). O meio de tratamento foi substituído a cada 2 dias e, após 8 dias de tratamento das células, estas foram coletadas e analisadas.42
- Figura 6:** Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TA8Amino na linhagem celular SH-SY5H após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).51
- Figura 7:** Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TAHB3 na linhagem celular SH-SY5H após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).51
- Figura 8:** Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TA8Amino na linhagem celular HepG2 após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).53

Figura 9: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TAHB3 na linhagem celular HepG2 após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).53

Figura 10: Células da linhagem celular SH-SY5Y após 8 dias de tratamento com os compostos híbridos e controles. As alterações morfológicas e a neurodiferenciação (setas indicam formação de neuritos) são observadas sob ampliação de 20x utilizando microscópio invertido (*Carl Zeiss*). Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinoico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).55

Figura 11: Células SH-SY5Y apresentando redes de interconexões (círculos pontilhados) entre neurônios maduros diferenciados após 8 dias de tratamento com AR 10 μ M (A) e TA8Amino 0,014 μ M (B); ampliação de 20x utilizando microscópio invertido (*Carl Zeiss*).56

Figura 12: Porcentagens de células neurodiferenciadas na linhagem celular SH-SY5Y (A) Foram consideradas células neurodiferenciadas aquelas que exibiam extensão de pelo menos um neurito apresentando um comprimento superior ao diâmetro do corpo celular. (B) Comprimento dos neuritos avaliados pelo *software ImageJ (Fiji)* em 100 células analisadas aleatoriamente. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo ou entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).57

Figura 13: Expressão da proteína β -III-Tubulina (~55kDa) e β -actina (~45kDa) analisada por *Western Blotting* após a neurodiferenciação por 8 dias na linhagem SH-SY5Y. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).59

Figura 14: Níveis de expressão da proteína β -III-Tubulina após a neurodiferenciação das células SH-SY5Y submetidas a tratamentos com os compostos AChEI. Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina, utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. A análise estatística foi realizada pelo teste *t*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo (DMSO). Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).59

Figura 15: Cinética do ciclo celular após 8 dias de neurodiferenciação na linhagem SH-SY5Y. A análise do ciclo celular de células diferenciadas foi realizada pela detecção e classificação de células com diferentes perfis de IP incorporado (citometria de fluxo). Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M). 60

Figura 16: Proliferação celular em resposta aos tratamentos com os compostos, analisada por citometria de fluxo, durante a neurodiferenciação para determinação do número de células viáveis por meio do kit de viabilidade celular *Kit Guava ViaCount (Merk Millipore)*. Análise estatística: *One-Way Anova*, pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando os resultados foram comparados ao controle negativo ou entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).62

Figura 17: A produção de ROS intracelular foi mensurada pela marcação com o corante *Dihydroethidium* (DHE-1,5 μ M). (A) Histograma da intensidade de fluorescência de DHE (B) Gráfico representativo da fluorescência média de DHE em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).64

Figura 18: Produção de ROS mitocondrial mensurada pela marcação com o corante *MitoSox red* (1,5 μ M). (A) Histograma da intensidade de fluorescência de *MitoSox red* (B) Gráfico representativo da fluorescência média de *MitoSox red* em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle

positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).....65

Figura 19: Potencial de membrana mitocondrial avaliado pela marcação com o corante TMRM (*Tetramethylrhodamine* - 40 nM). (A) Histograma da intensidade de fluorescência de TMRM (B) Gráfico representativo da fluorescência média de TMRM em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).....67

Figura 20: Massa mitocondrial mensurada pela marcação com o corante *Mitotraker green* (50 μ M). (A) Histograma da intensidade de fluorescência de *Mitotraker green* (B) Gráfico representativo da fluorescência média de *Mitotraker green* em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).....68

Figura 21: Expressão da proteína Fosfo-PTEN_(Ser380/Thr382/383) (~54kDa), Fosfo-Akt_(Ser473) (~60kDa), COX2 (~69kDa), SOD1 (~18kDa) e β -actina (~45kDa) analisada por *Western Blotting* após a neurodiferenciação por 8 dias na linhagem SH-SY5Y. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).....70

Figura 22: Expressão proteica avaliada após a neurodiferenciação das células SH-SY5Y submetidas a tratamentos com os compostos AChEI. (A) Expressão proteica de Fosfo-PTEN_(Ser380/Thr382/383) (~54kDa); (B) Fosfo-Akt_(Ser473) (~60kDa); (C) COX2 (~69kDa); (D) SOD1 (~18kDa). Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina (~45kDa), utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. *Teste t* foi utilizado para as análises estatísticas. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).71

Figura 23: Porcentagem de células viáveis após ensaio de neuroproteção frente aos danos por estresse oxidativo induzidos pelo H_2O_2 (100 μ M), analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount* (Merck Millipore). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (H_2O_2). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).73

Figura 24: Porcentagem de células viáveis após ensaio de neuroproteção frente aos danos neurotóxicos induzidos pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ (25 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount* (Merck Millipore). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo ($A\beta_{(1-42)}$). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).75

Figura 25: Porcentagem de células apoptóticas (células positivas para anexina V) após ensaio de neuroproteção frente ao dano por estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 (100 μ M); os resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin* (Guava Technologies). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (H_2O_2). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).76

Figura 26: Porcentagem de células apoptóticas (células positivas para anexina V) após ensaio de neuroproteção frente ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ (25 μ M); os resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin* (Guava Technologies). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo ($A\beta_{(1-42)}$). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos com atividade inibitória da hAChE Humana e hBuChE Humana. IC ₅₀ : 50% da concentração inibitória máxima. (dados extraídos de Chierito, 2017).....	40
Tabela 2: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações dos inibidores de AChE (TA8Amino e TAHB3) avaliadas nos tempos de 24, 48, 72 e 120 horas na linhagem SH-SY5Y. Análise estatística: <i>One-Way Anova</i> com pós teste <i>Newman-Keuls</i> . Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.	52
Tabela 3: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações dos inibidores de AChE (TA8Amino e TAHB3) avaliadas nos tempos de 24, 48, 72 e 120 horas na linhagem HepG2. Análise estatística: <i>One-Way Anova</i> com pós teste <i>Newman-Keuls</i> . Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.	54
Tabela 4: Porcentagem de células neurodiferenciadas e comprimento de neuritos em micrômetro (μm) na linhagem SH-SY5Y após 8 dias de diferenciação. Aplicou-se o teste estatístico <i>One-Way Anova</i> com pós teste <i>Newman-Keuls</i> . Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.....	58
Tabela 5: Níveis de expressão da proteína β -III-Tubulina após a neurodiferenciação na linhagem SH-SY5Y. Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina, utilizando o programa <i>Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)</i> . Análise estatística realizada pelo teste <i>t</i> . Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.	60
Tabela 6: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo após 8 dias de neurodiferenciação na linhagem celular SH-SY5Y. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.....	61
Tabela 7: Proliferação celular durante 8 dias de neurodiferenciação na linhagem celular SH-SY5Y. Análise estatística <i>One-Way Anova</i> com pós teste <i>Newman-Keuls</i> . Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.	62
Tabela 8: Avaliação dos parâmetros mitocondriais após 8 dias de neurodiferenciação e tratamento com os compostos. Análise estatística <i>One-Way Anova</i> com pós teste <i>Newman-Keuls</i> . Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.	69

Tabela 9: Níveis de expressão proteica avaliadas após 8 dias de neurodiferenciação das células SH-SY5Y submetidas a tratamentos com os compostos AChEI. Fosfo-PTEN_(Ser380/Thr382/383) (~54kDa), Fosfo-Akt_(Ser473) (~60kDa), COX2 (~69kDa), SOD1 (~18kDa) analisada por *Western Blotting*. Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina (~45kDa), utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Análise estatística realizada pelo teste *t*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. 72

Tabela 10: Avaliação da viabilidade celular do ensaio de neuroproteção frente aos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ (100 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount (Merck Millipore)*. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. 74

Tabela 11: Avaliação da viabilidade celular do ensaio de neuroproteção frente aos danos neurotóxicos induzidos pelo peptídeo A β ₍₁₋₄₂₎ (25 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount (Merck Millipore)*. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. 75

Tabela 12: Porcentagem de células apoptóticas e necróticas observado após o ensaio de neuroproteção frente ao dano oxidativo induzido pelo H₂O₂ (100 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin (Guava Technologies)* quantificando as celular positivas para anexina V e 7-AAD. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. 77

Tabela 13: Porcentagem de células apoptóticas e necróticas observado após o ensaio de neuroproteção frente ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo A β ₍₁₋₄₂₎ (25 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin (Guava Technologies)* quantificando as celular positivas para anexina V e 7-AAD. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. 78

LISTA DE ABREVEATURAS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
AChEI	Inibidor da enzima acetilcolinesterase
AKT	<i>Protein kinase B</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
AR	Ácido retinóico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
A β	Beta-amiloide
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CAS	Sítio periférico
CBRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CRABP2	<i>Cellular retinoic acid-binding protein 2</i>
DA	Doença de Alzheimer
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ERK 1/2	<i>Signal-regulated kinases 1/2</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAM F10	<i>F-10 Nutrient Medium</i>
HClO	Ácido hipocloroso
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MT	Meio de tratamento
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NFT	<i>Neurofibrillary tangles</i>

NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-metil D-Aspartato
PAS	Sítio ativo
PBS	Solução tampão fosfato
PC12	Feocromocitoma da medula adrenal de rato
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RARs	Receptores de ácido retinoico
RAR- α	Receptores de ácido retinoico-alfa
RAR- β	Receptores de ácido retinoico-beta
RAR- γ	Receptores de ácido retinoico-gama
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptor X retinóide
SH-SY5Y	Subclone neuroblástico da linhagem de neuroblastoma humano
SK-N-SH	Linhagem de neuroblastoma humano
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TH	Tirosina hidroxilase
TMRM	<i>Tetramethylrhodamine</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Doença de Alzheimer	22
1.2. Estratégias terapêuticas na DA	23
1.3. Estresse Oxidativo	26
1.4. Mecanismos de neuroproteção	29
1.5. Modelo neuronal SH-SY5Y no estudo da Doença de Alzheimer	31
2. OBJETIVOS	37
2.1. Objetivos Específicos	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo	39
3.2. Compostos inibidores da AChE	39
3.3. Agentes indutores de dano	40
3.4. Ensaio de viabilidade celular	41
3.5. Ensaio de diferenciação celular	42
3.6. Avaliação de expressão proteica por <i>Western Blotting</i>	43
3.6.1. Extração de proteínas com solução de lise	43
3.6.2. Eletroforese de proteínas	43
3.6.3. Imunodeteção e visualização das proteínas	44
3.7. Análise da cinética do ciclo celular	44
3.8. Proliferação e viabilidade celular por citometria de fluxo	45
3.9. Análise de geração de ROS	45
3.10. Quantificação de massa mitocondrial	46
3.11. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	46
3.12. Análise de morte celular	47
3.13. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	50
4.1. Ensaios de Citotoxicidade e Hepatotoxicidade	50
4.2. Ensaios de diferenciação neuronal induzidos pelos AChEI	54
4.2.1. Análise de neurodiferenciação e alterações morfológicas	54
4.2.2. Quantificação das células neurodiferenciadas e comprimento de neuritos	56

4.2.3. Expressão proteica do marcador de neurônio β -III-Tubulina	58
4.2.4. Análise das alterações da cinética do ciclo celular nas células neurodiferenciadas pelos AChEI	60
4.2.5. Curva de proliferação celular durante os 8 dias de neurodiferenciação induzida pelos AChEI	61
4.2.6. Efeitos dos tratamentos com os compostos sobre os parâmetros mitocondriais nas células submetidas à neurodiferenciação	63
4.2.7. Avaliação da expressão proteica de PTEN _(Ser380/Thr382/383) , Akt _(Ser473) , COX2 e SOD1	69
4.3. Ensaio de neuroproteção frente a danos oxidativos e neurotóxicos induzidos pelo H ₂ O ₂ e pelo peptídeo A β ₍₁₋₄₂₎	72
4.3.1 Viabilidade celular	72
4.3.2. Indução de morte celular	76
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

Desde a sua descoberta, a doença de Alzheimer (DA) tornou-se a enfermidade neurodegenerativa mais estudada em todo o mundo. Em 2018, cerca de 50 milhões de pessoas no mundo foram identificadas com demência, sendo estimado que cerca de 152 milhões de pessoas poderão apresentar a DA até 2050 (Alzheimer's Disease International, 2018). As alterações fisiopatológicas dessa doença causam o comprometimento cognitivo, funcional e comportamental nos pacientes (Villemagne et al., 2015). Além da perda neuronal, outras alterações também têm sido associadas à DA, tais como disfunção mitocondrial, deposição de peptídeos beta-amiloide ($A\beta$) e processos inflamatórios (Caspersen et al., 2005; Hirai et al., 2001; Isaacs et al., 2006; Wyss-Coray; Mucke, 2002).

A maioria dos casos de DA ocorre de forma esporádica, atingindo indivíduos acima de 65 anos de idade. Por outro lado, cerca de 5% dos casos apresentam um desenvolvimento precoce, com sintomas perceptíveis antes de 65 anos; estes são recorrentes nas famílias que apresentam, em geral, um padrão de herança autossômica dominante. Os marcadores neuropatológicos mais frequentes observados em DA são a agregação de peptídeos $A\beta$ em oligômeros, uma estrutura compacta fora dos neurônios, além dos emaranhados neurofibrilares (NFT – *neurofibrillary tangles*), os quais são agregados de proteína tau hiperfosforilada, com localização intracelular; ocasionando um processo inflamatório e, consequentemente, danos na substância branca (Avramopoulos, 2009).

Os peptídeos $A\beta$ são derivados do processamento proteolítico anormal de proteínas APP (*amyloid precursor protein*) por enzimas de processamento (β - e γ -secretases) resultando no acúmulo de proteínas amiloides $A\beta_{(1-40)}$ e $A\beta_{(1-42)}$, que se agregam progressivamente, no entanto, $A\beta_{(1-42)}$ é mais fibrilogênica; portanto, está mais associada ao estado de doença (Gorlovoy et al., 2009; Wen et al., 2017). A hiperfosforilação anormal da proteína tau ocasiona um tipo específico de neurodegeneração lenta e progressiva, levando a degeneração neurofibrilar, observada como emaranhados neurofibrilares, fios neuropilares e neuritos distróficos (Iqbal et al., 2009). Estas alterações são diretamente

responsáveis pela manifestação das características clínicas da DA, ocasionando o esgotamento da acetilcolina cerebral o que seria a principal causa de declínio cognitivo em indivíduos com idade avançada e em pacientes DA, uma vez que o sistema colinérgico exerce um papel importante na regulação dos processos de aprendizagem e memória, razão pela qual o mesmo tem sido alvo de estudo no desenvolvimento de drogas para o tratamento da DA (Anand; Singh, 2013; Douchamps; Mathis, 2017).

A etiologia da DA em nível celular e molecular é complexa e ainda pouco compreendida, mas há evidências de que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo também possam desempenhar papéis cruciais no desenvolvimento da doença (Bhat et al., 2012; Liu et al., 2016). Desta forma, anormalidades mitocondriais, tais como o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS, do Inglês: Reactive Oxygen Species), e deficiência de defesa antioxidante, são eventos chave nessa patologia (García-Escudero et al., 2013; Liu et al., 2017), sendo relatados precocemente na DA, mesmo anteriormente à formação dos NFTs (Hirai et al., 2001). Foi, ainda, relatado que marcadores de dano oxidativo encontram-se elevados em mitocôndrias isoladas de linfócitos em pacientes com DA (Sultana et al., 2011), sendo que ao longo da idade, a geração aumentada de ROS nas mitocôndrias acelera o acúmulo de A β (Leuner et al., 2012), havendo um ciclo vicioso mediado pelas mitocôndrias, na qual a A β intracelular induz a disfunção mitocondrial e ROS, os quais aceleram ainda mais o acúmulo de A β no cérebro de pacientes com a DA (Oka et al., 2016). Além disso, a proteína tau fibrilar também exerce seus efeitos neurotóxicos pelo aumento do estresse oxidativo, geração de ROS, apoptose neuronal, disfunção mitocondrial e necrose (De La Monte; Wands, 2008; Mandelkow et al., 2003). Entretanto, apesar das informações acumuladas na literatura, os mecanismos moleculares ainda requerem elucidação.

1.2. Estratégias terapêuticas na DA

As principais estratégias terapêuticas na DA visam controlar ou retardar a progressão da doença ou de seus sintomas (Wen et al., 2017). Durante os últimos anos, vários medicamentos colinérgicos foram lançados no mercado, principalmente os inibidores de enzima acetilcolinesterase (AChE), os quais têm sido indicados para o tratamento de

pacientes com DA leve ou moderada. Dentre esses, os medicamentos donepezila, rivastigmina e galantamina (Alonso et al., 2005) são comercializados como formulações orais (exceto rivastigmina, que também está disponível como um adesivo transdérmico) (WEN et al., 2017). Há também outros fármacos como memantina, que atua nos receptores NMDA (N-metil D-Aspartato) (**figura 1**) (Mendiola-Precoma et al., 2016).

Figura 1: Estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento da DA (Chierrito, 2016).

Estes medicamentos são utilizados para manter estável a concentração de acetilcolina no cérebro, por reduzir a hidrólise desta em consequência da inibição da AChE, desta forma combatendo a deficiência de acetilcolina causada pela morte dos neurônios colinérgicos. No entanto, há uma série de limitações quanto ao uso desses medicamentos, em face aos efeitos colaterais periféricos (náuseas, vômitos, diarreia e tremores) (Luo et al., 2015). Um exemplo dessas limitações foi observado quanto ao medicamento tacrina que também é um inibidor competitivo da colinesterase e foi o primeiro medicamento licenciado pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos da América (EUA) para o tratamento da DA; apesar de ser um excelente inibidor da AChE, a tacrina foi retirada do mercado em maio de 2012, devido à sua baixa tolerabilidade por ocasionar hepatotoxicidade grave em cerca de 30% dos pacientes tratados (Gao et al., 2014; Zhang et al., 2016). Esses dados apontam a

necessidade de buscar novas moléculas que sejam mais eficientes e com menos efeitos colaterais para o tratamento de pacientes com DA (Luo et al., 2015).

Dentre os medicamentos utilizados para o tratamento da DA, donepezila e galantamina têm sido os mais utilizados (Alonso et al., 2005). Especificamente, a AChE é um componente importante das placas A β , em particular, pelo fato desta se ligar ao peptídeo A β , promovendo assim a formação de fibrilas A β e a ocorrência de neurotoxicidade (Xiang et al., 2014). Supõe-se que os inibidores específicos de AChE possam impedir a agregação adicional de fibrilas A β , levando à neuroproteção (Zimmermann, 2013). Ainda, alguns estudos com modelos neuronais da DA têm demonstrado que compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChEs) (galantamina, donepezila e rivastigmina) protegem as células contra o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo A β , sendo que essa proteção tem sido relacionada principalmente à capacidade antioxidante desses compostos, como também pela indução de vias de sinalização PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol-3-kinase/Protein kinase B*) e bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Arias et al., 2005) que são importantes para a sobrevivência celular, sendo PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) um importante regulador negativo dessa via (Alonso et al., 2005).

Assim, uma nova série de híbridos de donepezila-tacrina estão sendo sintetizados como inibidores duplos da AChE, com capacidade de se ligarem simultaneamente aos sítios periférico e catalítico da enzima, dotados de um melhor potencial para o tratamento da DA, conforme demonstrado em estudos preliminares realizados em modelos *in vitro* (Alonso et al., 2005).

Nessa linha de pesquisa, visando à obtenção de moléculas de alta eficiência frente ao alvo terapêutico e que sejam pouco citotóxicos para os pacientes, Chierrito e colaboradores (2017) do Laboratório de Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Ivone Carvalho, sintetizaram derivados híbridos de donepezila-tacrina (fármacos inibidores de acetilcolinesterase), com potencial para agir na inibição da acetilcolinesterase em ambos os sítios ativo (PAS) e periférico (CAS), demonstrado por estudos de modelagem molecular; um processo de hibridação molecular, representado pela conjugação das principais características estruturais dos dois fármacos em uma única substância bioativa, foi aplicado para melhorar as propriedades farmacodinâmicas desta classe de compostos inibidores de

AChE (**figura 2**), constituindo uma alternativa promissora para o desenvolvimento de fármacos a serem utilizados na prática clínica.

Figura 2: Estratégia de hibridação molecular, envolvendo os fármacos donepezila e tacrina para obtenção do híbrido, capaz de interagir nos sítios ativo (PAS) e periférico (CAS) da AChE como *dual binding site* (Chierrito, 2016).

1.3. Estresse Oxidativo

O avanço da idade impõe um aumento progressivo na produção de ROS, além de reduzir a capacidade de defesa antioxidante do organismo (Cui et al., 2012; Kong et al., 2014). Existem dados consistentes na literatura os quais demonstram que a falta de equilíbrio entre a geração de ROS e a eficácia dos mecanismos de defesa antioxidante favorecendo o estado pro-oxidante nas células resulta em uma condição de estresse oxidativo (Cui et al., 2012; Saha et al., 2005; Kong et al., 2014), a qual se agrava progressivamente com o avançar da idade, desencadeando o desenvolvimento de doenças metabólicas, cardiovasculares e degenerativas (Görlach et al., 2015; Lobo et al., 2010; Miller et al., 1990).

As células de todos os organismos aeróbicos produzem a maior parte da energia química consumindo oxigênio em suas mitocôndrias. Estas são, portanto, as principais fontes locais de oxigênio intracelular e de formação de ROS (Ames, 2004). Entretanto, as ROS podem ser geradas em diferentes compartimentos celulares, além das mitocôndrias, como o retículo endoplasmático, lisossomas, peroxissomas e membranas, por ação de vários estímulos (nutrientes, fatores de crescimento, hormônios, citocinas, radiações, tensão de oxigênio, etc.). Apesar dos efeitos prejudiciais das ROS devido às reações químicas primárias com as macromoléculas (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos), há evidência crescente sobre o seu papel na modulação de processos celulares por meio de sinalização dependente do sistema redox (Görlach et al., 2015).

O termo "ROS" inclui todos os metabólitos instáveis da molécula de oxigênio (O_2), entre os quais os radicais livres (que têm maior reatividade) e as moléculas não radicalares (Ames, 2004). Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares. Radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicais geradas em sistemas vivos (Valko et al., 2007). Estes intermediários são potencialmente perigosos, devido à sua alta reatividade, como a radical hidroxila ($\bullet OH$), ou os precursores que facilmente formam espécies muito reativas, como o superóxido ($O_2\bullet^-$), que junto ao óxido nítrico ($NO\bullet$) leva à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Cheignon et al., 2018). No meio extracelular, o peroxinitrito reage com oxigênio e água para formar ânions nitrato e nitrito, denominados espécies reativas de nitrogênio (RNS), que em conjunto com as ROS, são produtos do metabolismo celular normal. Ainda, os $NO\bullet$ possuem efeitos na transmissão neuronal, bem como na plasticidade sináptica do sistema nervoso central (Valko et al., 2007).

As principais espécies de oxigênio não-radicalares são o O_2 , peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HClO$) (Barreiros et al., 2006). O H_2O_2 é a principal espécie de oxigênio não-radicalar, produzido pela reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) a partir do ânion superóxido. Posteriormente, H_2O_2 pode ser removido por enzimas antioxidantes, tais como a catalase e peroxidase, que convertem H_2O_2 em água e oxigênio. O H_2O_2 mitocondrial pode atravessar a membrana e servir como molécula sinalizadora, sendo

que em altas concentrações, pode contribuir para o estresse oxidativo (Larosa; Remacle, 2018).

É importante ser enfatizada a existência de mecanismos de defesa celular e tecidual que estão envolvidos na eliminação das ROS; esse sistema de defesa antioxidante inclui as enzimas: superóxido dismutase (Mn-SOD, Cu / Zn-SOD), catalase, glutational peroxidase, peroxirredoxinas e os antioxidantes não enzimáticos, glutational, tioredoxina, ascorbato, α -tocoferol e ácido úrico (Poljsak, 2011). No organismo, há necessidade de manutenção do equilíbrio entre a produção de ROS e antioxidantes, uma vez que as ROS desempenham um papel importante na regulação fisiológica da biogênese mitocondrial. Portanto, o desequilíbrio entre ROS e antioxidantes pode levar a diversos danos celulares como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de bases do DNA e RNA, alterações na sinalização celular, disfunção mitocondrial, entre outros efeitos (Ortuño-Sahagún et al., 2014).

Na DA, o peptídeo A β apresenta um forte efeito sobre as enzimas mitocondriais, principalmente em células neuronais, uma vez que, nessas células as sinapses possuem uma maior demanda pela produção de ATP (adenosina trifosfato) e consumo de energia (Picone et al., 2014). Em culturas mistas de neurônios do hipocampo e células gliais de ratos *Sprague Dawley*, analisados 2 a 4 dias após o nascimento, (Abramov et al., 2017) demonstraram que o peptídeo A β é capaz de reduzir os níveis de ATP por meio da inibição dos complexos I e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, induzindo despolarização mitocondrial, sendo esta dependente da sinalização do cálcio induzida pelo peptídeo A β e da geração de ROS a partir da NADPH oxidase (Abramov et al., 2017). Ainda, os íons de metais ativos redox, como o ferro, podem catalisar a produção de ROS quando ligados ao peptídeo A β . As ROS assim produzidas, em particular o HO•, que é o mais reativo, pode contribuir para o dano oxidativo, tanto no próprio peptídeo A β como em outras macromoléculas (proteínas, lipídios, DNA e RNA) (Cheignon et al., 2018).

Existem evidências convincentes de que a estrutura e a função mitocondrial aberrantes são marcas importantes da DA, demonstrando um quadro de disfunção mitocondrial (Wojsiat et al., 2018). Dada a evidência acumulada de disfunção mitocondrial em estágio inicial na DA, potencialmente produzindo outros fenômenos moleculares na DA, mesmo na ausência de placas A β e emaranhados tau, a disfunção mitocondrial pode estar

no centro do desenvolvimento da DA (Cadonic et al., 2016). Além disso, foram relatadas alterações na expressão gênica e na atividade de enzimas mitocondriais, como a citocromo c oxidase, o complexo α -cetoglutarato desidrogenase e o complexo piruvato desidrogenase; tais enzimas mostraram atividade reduzida na DA (Wojsiat et al., 2018).

A maioria dos danos causados ao sistema nervoso de pacientes com DA são irreversíveis devido à falência da neurogênese e ao aumento da morte de neurônios, os quais são eventos que ocorrem antes da detecção dos sintomas clínicos da doença. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese torna-se fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas capazes de prevenir a progressão da neurodegeneração. Desta forma, novas moléculas sintéticas com atividade antioxidante e neuroprotetora têm sido desenvolvidas com o intuito de proporcionar tratamentos mais eficazes para os pacientes com a DA (Luchtman et al., 2012; Zhang et al., 2017). O objetivo da neuroproteção, nestes casos, é minimizar a disfunção neuronal ou morte após a lesão do sistema nervoso central (SNC), na tentativa de manter a integridade das interações celulares no cérebro, reduzindo assim alterações nas funções neuronais (Hao et al., 2017). Por conseguinte, a possibilidade de encontrar estratégias para minimizar os efeitos de ROS pode abrir um caminho promissor na busca de terapias para os pacientes com doenças neurodegenerativas.

1.4. Mecanismos de neuroproteção

A neurodegeneração é uma das principais causas de disfunção cognitiva e motora na DA, devido à perda progressiva de estrutura e função dos neurônios do SNC, com consequente morte destes (Amor et al., 2014). Em vista disso, novos métodos e estratégias têm sido desenvolvidos na tentativa de alcançar proteção contra danos neuronais, os quais envolvem apoptose, disfunção neuronal, estresse oxidativo e degeneração. O objetivo final é minimizar a disfunção ou morte neuronal, na tentativa de manter a integridade das interações celulares no cérebro, reduzindo assim alterações nas funções neuronais (Hao et al., 2017). Supõe-se que os inibidores específicos de AChE possam impedir a agregação adicional de fibrilas A β , levando à indução de neuroproteção. De fato, as pesquisas com

drogas sintéticas inibidoras da AChE tendem a avançar em direção aos inibidores que sejam capazes de reduzir a deposição de amiloide (Zimmermann, 2013).

Neste contexto, os inibidores da AChE têm demonstrado atenuar a morte neuronal induzida pela toxicidade do peptídeo A β . Os fármacos inibidores da AChE, como donepezila ou galantamina, podem exercer um efeito neuroprotetor por meio da via PI3K/AKT que tem uma função de pró-sobrevivência em neurônios expostos a vários estímulos indutores de apoptose (Arias et al., 2005). A via PI3K/AKT está envolvida principalmente na proteção de neurônios corticais contra oxidação de proteínas, bem como na lipoperoxidação e disfunção mitocondrial (Jiang et al., 2016).

Em estudos *in vitro*, foi relatado que donepezila atenua a lesão neuronal induzida por A β ₍₂₅₋₃₅₎, A β ₍₁₋₄₀₎, peróxido de hidrogênio, privação de oxigênio-glicose e pelo glutamato em diversos modelos neuronais, sugerindo que essa droga tenha um efeito potencialmente neuroprotetor na DA, mas em concentrações superiores às necessárias para a inibição da AChE. De forma geral, a donepezila melhora a função colinérgica retarda neurodegeneração progressiva dos pacientes com DA (Kimura et al., 2005).

Atualmente a neurogênese tem sido reconhecida como um mecanismo importante ligado à auto-renovação dos neurônios ao longo da vida do indivíduo, sendo também estudado como uma abordagem importante para o desenvolvimento de novas terapias para as doenças neurodegenerativas. A neurogênese adulta é definida como o processo de geração de neurônios funcionais a partir de células progenitoras e integração desses novos neurônios nos circuitos neuronais do cérebro (Sailor et al., 2017). No cérebro humano adulto existem dois nichos de células-tronco que se localizam nas zonas subventricular e subgranular, capazes de gerar novos neurônios. Como os mecanismos de auto-reparo neuronal diminuem com o avanço do envelhecimento, a estimulação farmacológica de nichos neurogênicos pode parcialmente compensar a perda neuronal observada na DA (Estrada Valencia et al., 2018).

Interessante também é o fato de que vias de sinalização envolvidas em processos neurogênicos têm sido identificadas, sendo estas relevantes para o estudo da ação de diferentes tipos de drogas, atualmente em desenvolvimento, quanto à plasticidade neuronal. Por exemplo, dados recentes sugerem que os efeitos pró-cognitivos proporcionados pelo fármaco donepezila podem ser devidos ao aumento da neurogênese

no hipocampo, além de promover novas conexões neuronais e estimular o crescimento de neuritos, demonstrando que o tratamento com donepezila melhorou a recuperação da aprendizagem espacial e da memória em modelo de camundongos (Estrada Valencia et al., 2018). Portanto, neurogênese e neuroproteção surgiram recentemente como a base fundamental para o desenvolvimento de estratégias inovadoras e complementares para o tratamento da DA. O desenvolvimento de novos agentes capazes de proteger as populações neuronais mais vulneráveis, ou até mesmo substituir os neurônios danificados por novas células funcionalmente competentes, apresenta o potencial de fornecer novos regimes terapêuticos mais eficazes para os pacientes (Estrada Valencia et al., 2018; Yu et al., 2015). Desta forma, há necessidade de investigar a citotoxicidade e os mecanismos de ação de potenciais fármacos em desenvolvimento.

1.5. Modelo neuronal SH-SY5Y no estudo da Doença de Alzheimer

Existe uma carência de modelos neuronais disponíveis para a pesquisa de potenciais fármacos voltados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, havendo grande dificuldade na utilização de modelos *in vitro*, visto que as células de neurônios primários de mamíferos, uma vez diferenciadas terminalmente em neurônios maduros, não podem mais ser propagadas. No entanto, linhagens celulares neuronais transformadas podem ser usadas *in vitro* para superar essa limitação (Kovalevich; Langford, 2013), sendo que alguns modelos celulares têm sido utilizados para elucidar os mecanismos de diferenciação e maturação neuronal. Um desses modelos é a linhagem celular de neuroblastoma humano (*SH-SY5Y*), que é tipicamente bloqueada em um estágio inicial de diferenciação neuronal, caracterizado por baixos níveis de marcadores neuronais (Kunzler et al., 2017).

As células *SH-SY5Y* são um subclone neuroblástico da linhagem de neuroblastoma *SK-N-SH* e, apesar de sua origem tumoral, são capazes de exibir um fenótipo neuronal funcional e morfológico na exposição *in vitro* a vários agentes, tais como o ácido retinoico (AR), um metabólito ativo do retinol (Frota Junior et al., 2011). Por meio da exposição a condições de

diferenciação apropriadas com AR, as células *SH-SY5Y* podem ser direcionadas para fenótipos neuronais diferenciados e maduros (Kunzler et al., 2017).

Na forma indiferenciada, as células *SH-SY5Y* são caracterizadas morfologicamente por corpos celulares não polarizados, semelhantes a neuroblastos, com poucos processos truncados. As células tendem a crescer em aglomerados e podem formar agrupamentos à medida que as células crescem umas sobre as outras na região central de uma massa celular. A linhagem celular *SH-SY5Y* inclui pelo menos dois fenótipos morfológica e bioquimicamente distintos: neuroblástico (tipo N) e aderente ao substrato (tipo S). Alguns estudos sugerem que as células flutuantes do tipo “N” são mais propensas a aderirem e diferenciarem com AR do que as células aderentes do tipo “S” presentes em culturas indiferenciadas (Kovalevich; Langford, 2013; Kunzler et al., 2017).

Figura 3: Células *SH-SY5Y* diferenciadas mostrando dois tipos morfolologicamente distintos: “S” e “N”. Célula do tipo “N” é mais semelhante a um neurônio, com corpos em forma de pirâmide e neuritos longos (indicados pelas setas). Células do tipo “S” epiteliais, sem neuritos (indicados pelos asteriscos).

Após o tratamento com agentes indutores de diferenciação, as células *SH-SY5Y* se tornam morfolologicamente mais semelhantes aos neurônios primários com neuritos alongados e passam a expressar marcadores moleculares de neurônios maduros (Kovalevich; Langford, 2013), tornando-se um modelo neuronal que pode ser cultivado *in vitro* para estudos de neurotoxicidade ou neuroproteção na pesquisa experimental.

O ácido retinóico, um produto metabólico da vitamina A, é um morfógeno bem conhecido e importante que induz a diferenciação de células-tronco em várias linhagens celulares (Hou et al., 2014). O AR está envolvido na padronização neuronal, na diferenciação neuronal e no crescimento dos axônios (Maden, 2007). A maioria dos efeitos do AR é

exercida pela ligação de alta afinidade aos receptores de ácido retinoico (RARs). Os RARs incluem três subtipos: RAR-alfa (RAR- α), RAR-beta (RAR- β) e RAR-gama (RAR- γ), todos os quais são reguladores transcricionais de ligação ao DNA (Chen et al., 2014). O AR entra no núcleo, assistido por CRABP2 (*Cellular retinoic acid-binding protein 2*), e liga-se a um complexo de transcrição que inclui um par de fatores de transcrição ativados por ligantes compreendendo o heterodímero do receptor X retinóide (RXR) do receptor AR (RAR) (Maden, 2007). Deste modo, resulta na ativação das vias de sinalização pela MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e PI3K contribuindo para a diferenciação induzida pelo ácido retinóico. O AR através do envolvimento e ativação de RAR e ERK 1/2 (*Signal-regulated kinases 1/2*) induz a síntese de COX-2 (*Cyclooxygenase 2*) e PGE2 (*Prostaglandin E2*) em células SH-SY5Y de neuroblastoma (Roy Choudhury et al., 2012). Assim, a AR desencadeia uma sinalização *downstream* que está envolvida na manutenção de neurônios adultos e células-tronco neurais e induz o crescimento de axônios e regeneração celular (Hou et al., 2014).

Figura 4: Via de indução de diferenciação neuronal pelo ácido retinoico a partir da ligação aos receptores de ácido retinoico (RAR/RXR). Baseado em Roy Choudhury e colaboradores (2012) e Maden (2007).

Além disso, há evidência de que os efeitos pró-oxidantes da AR são necessários e limitantes para a diferenciação de células SH-SY5Y ao mesmo tempo que reduz a oxidação mitocondrial de NADH (Kunzler et al., 2017). Nessas células, pelo menos três linhas de evidências implicam mitocôndrias como fatores-chave da diferenciação induzida por AR. Primeiro, o processamento metabólico de retinóides na mitocôndria envolve duas etapas de oxidação. Segundo, o tratamento com AR altera a localização do receptor de AR para a mitocôndria e induz a expressão de genes associados à mitocôndria. Terceiro, o AR regula a expressão gênica diretamente por meio da ação dos receptores de AR (α , β e γ) localizados na mitocôndria, ou indiretamente, por meio de sua influência no fluxo de glicose. Em conjunto, esses dados indicam que as consequências fisiológicas do tratamento com AR nas

células SH-SY5Y estão ligadas à mitocôndria, embora o seu papel não seja ainda bem compreendido (Xun et al., 2012).

A diferenciação neuronal de células de neuroblastoma induzidas pelo AR inibe a proliferação celular, altera a condutividade celular do sódio, aumenta o crescimento de neuritos e aumenta a atividade da AChE (Maden, 2007; Teppola et al., 2016). Além disso, neurônios derivados do tratamento da SH-SY5Y com AR por 7 a 10 dias expressam marcadores específicos de neurônios, como tirosina hidroxilase (TH), enolase-2 e β -III tubulina, viabilizando o uso dessas células como modelo para estudos moleculares em diversas abordagens (Kunzler et al., 2017).

Com base no exposto, a hipótese do presente projeto se baseia na atividade de indução de neurodiferenciação e neuritogênese de compostos inibidores de AChE, os quais são híbridos sintéticos de donepezila-tacrina, além de atuarem como neuroprotetores em culturas de células neuronais, sob condições experimentais de um estímulo neurotóxico e de estresse oxidativo induzidos pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ e H_2O_2 . Os resultados gerados poderão fornecer informações de grande relevância quanto à atividade neuroprotetora de moléculas inéditas com potencial terapêutico, o que irá de encontro à grande necessidade de buscar novas drogas e tratamentos mais eficazes para os pacientes com a DA e que, ao mesmo tempo, sejam minimizados os efeitos colaterais; além disso, com a tendência mundial de aumento significativo dos casos de DA nas próximas décadas, estima-se uma maior demanda por tratamentos eficazes e de maior acesso aos pacientes.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

No presente projeto, objetiva-se avaliar a capacidade de neurodiferenciação e neuritogênese, assim como o potencial neuroprotetor de duas moléculas híbridas de donepezila-tacrina (TA8Amino e TAHB3) em células SH-SY5Y (linhagem derivada de neuroblastoma), testadas sob estímulo neurotóxico e de estresse oxidativo induzidos pelo peptídeo A β (1-42) e H₂O₂ em comparação aos fármacos donepezila ou tacrina, isoladamente.

2.1. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a citotoxicidade e hepatotoxicidade das moléculas sintéticas (híbridas de donepezila-tacrina) nas linhagens celulares SH-SY5Y e HepG2, respectivamente;
- 2) Estudar a capacidade de indução de diferenciação celular e crescimento de neuritos na linhagem SH-SY5Y tratada com os compostos híbridos (TA8Amino e TAHB3);
- 3) Quantificar a expressão proteica do marcador de neurodiferenciação β -III-tubulina, além de proteínas da via de sinalização PTEN/AKT e COX2, e de estresse oxidativo SOD1;
- 4) Avaliar as alterações de parâmetros mitocondriais após a neurodiferenciação sob condições de tratamento com os compostos híbridos;
- 5) Analisar as alterações no ciclo e proliferação celular na linhagem celular SH-SY5Y após a neurodiferenciação induzida pelas moléculas híbridas de donepezila-tacrina;
- 6) Avaliar a capacidade de neuroproteção das moléculas híbridas frente aos danos neurotóxicos e de estresse oxidativo causado pelo peptídeo A β (1-42) ou pelo H₂O₂, respectivamente;
- 7) Estudar a capacidade de indução de morte celular na linhagem celular SH-SY5Y, sob o estímulo neurotóxico e de estresse oxidativo pelo tratamento com o peptídeo A β (1-42) ou H₂O₂ em resposta aos tratamentos com as moléculas híbridas de donepezila-tacrina.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Para os ensaios celulares foi empregado as linhagens SH-SY5Y (neuroblastoma humano), adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (CBRJ) e HepG2 (Carcinoma hepatocelular humano) adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). As células foram cultivadas em frascos de cultivo (25 cm²) com meio de cultura completo, constituído de DMEM + HAM F10 (1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF-Gibco), 1% de solução de penicilina (100 unidades/mL- Sigma) e 1% de estreptomicina (10 mg/mL- Sigma). As células foram mantidas em proliferação até atingir a semi-confluência de 80% (~5x10⁶ células), quando foram utilizadas nos experimentos; as células foram despregadas dos frascos com solução de tripsina-EDTA (0,05%), subcultivadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ a 37° C para realização dos protocolos de tratamento. Inicialmente todas as linhagens celulares foram avaliadas quanto a presença ou ausência de contaminação por micoplasma, foi utilizado o corante hoechst 33342 (*Sigma-Aldrich*) para análise em microscópio de fluorescência (*Zeiss, Axioplan 2*). Foram utilizadas apenas linhagens celulares livres de contaminação por micoplasma.

3.2. Compostos inibidores da AChE

Os compostos inibidores da AChE foram fornecidos pelo Laboratório de Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Ivone Carvalho; os compostos são denominados TA8Amino e TAHB3 (Chierrito et al., 2017), além dos fármacos donepezila e tacrina que já são conhecidos pelo seu uso clínico como inibidores de acetilcolinesterase e foram utilizados como controle. As soluções dos compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em solução tampão fosfato (PBS) em concentrações compatíveis com os ensaios biológicos *in vitro*. As concentrações utilizadas foram baseadas

nos valores de 50% de inibição da enzima acetilcolinesterase (IC_{50}) com base nas curvas de dose-resposta obtidas anteriormente no Laboratório de Química Medicinal (Tabela 1, Chieritto, 2017). Os tempos de tratamento com as moléculas híbridas variaram de acordo com cada ensaio realizado.

Tabela 1: Compostos com atividade inibitória da hAChE Humana e hBuChE Humana. IC_{50} : 50% da concentração inibitória máxima. (dados extraídos de Chieritto, 2017).

Compostos	Estrutura Molecular	IC_{50} hAChE (μM)	IC_{50} hBuChE (μM)
Donepezila		0.0057 ± 0.0005	9.14 ± 0.56
Tacrina		0.23 ± 0.069	0.040 ± 0.002
TA8Amino		0.014 ± 0.009	3.69 ± 0.84
TAHB3		0.71 ± 0.17	6.54 ± 0.70

3.3. Agentes indutores de dano

Para o H_2O_2 (*Sigma-Aldrich*) foi utilizada a concentração de $100 \mu M$ por 4 horas para indução de dano por estresse oxidativo na linhagem SH-SY5Y de acordo com a literatura (Feng et al., 2016). O peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ foi dissolvido em água ultrapura (*MiliQ*) na concentração de 6 mg/mL e, em seguida, diluído em PBS (livre de Ca^{2+}) e armazenado a $-20^\circ C$. Para a utilização nas culturas celulares, o peptídeo ($25 \mu M$) foi incubado para agregação de fibrilas a $37^\circ C$ por 48 h e, em seguida, foi adicionado às culturas celulares por 24 horas.

Resumidamente, para os ensaios de neuroproteção as células foram semeadas em placas de 12 poços (6×10^4 células/poço) e após 24 de estabilização, foram adicionadas as

moléculas híbridas por 24 horas em meio DMEM/F10 sem SBF; após esse tratamento o meio foi removido e as células lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado o tratamento com o peptídeo A β ₍₁₋₄₂₎ por 24 horas ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 4 horas em meio DMEN/F10 sem SBF; após os tratamentos o meio foi removido, as células foram lavadas em PBS, sendo adicionado o meio DMEM/F10 com 10% de SBF. As células foram coletadas e analisadas após 5 dias de incubação.

3.4. Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade e hepatotoxicidade foram realizados com o kit-XTT (*Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular Biochemicals*), utilizado para a detecção de células viáveis baseado no princípio de que estas metabolicamente ativas devem clivar o sal amarelo tetrazolium XTT formando um corante formazam (cor alaranjada). A citotoxicidade foi avaliada na linhagem celular SH-SY5Y e a hepatotoxicidade na linhagem hepática HepG2. As células foram semeadas em placas de 96 poços para a linhagem HepG2 e 24 poços para a SH-SY5Y e tratadas com os compostos (TA8Amino e TAHB3). Para a linhagem HepG2 foram semeadas 10⁴ células/poço para a coleta após 24 e 48 horas; para a análise após 72h foram semeadas 2x10³ células/poço; e para a coleta após 120h 1x10³ células/poço. Quanto a linhagem SH-SY5Y foram semeadas 8x10⁴ células/poço para coleta de 24 e 48 horas e 4x10⁴ células/poço para coleta de 72 e 120 horas. Foram utilizadas diferentes concentrações acima e a baixo do IC₅₀ de inibição da AChE para os compostos testes TA8Amino e TAHB3. Ao final dos tratamentos empregados, as células foram incubadas com a solução XTT, permanecendo assim até que ocorra a mudança da coloração para alaranjado, assim foi realizado a leitura colorimétrica em um espectrofotômetro, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A absorbância foi medida em 492 e 690 nm (aparelho *Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek*) obtendo um resultado final diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra.

3.5. Ensaio de diferenciação celular

A diferenciação celular foi realizada utilizando a linhagem neuronal SH-SY5Y, onde as células foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^5 células/poço) seguindo protocolo de Lopes e colaboradores (2017). O meio de cultura com o tratamento dos compostos teste TA8Amino e TAHB3 e controles Donepezila e Tacrina nas concentrações de IC_{50} de inibição da AChE foi trocado a cada dois dias, para manter os tratamentos, até 8 dias completos (**figura 5**), o ácido retinoico (AR, $10 \mu M$) foi utilizado como controle positivo de neurodiferenciação. Para análise, foram tiradas ao todo 20 fotos de cada tratamento em uma ampliação de 20x utilizando microscópio de fase invertida (Zeiss) para quantificação do tamanho dos neuritos e células diferenciadas utilizando o *software ImageJ (Fiji)*. Foram consideradas células diferenciadas, aquelas que possuíam pelo menos um neurito maior que o diâmetro da célula, sendo quantificadas ao todo 100 células. Além disso, foi realizada a quantificação do tamanho dos neuritos dessas 100 células, de acordo com a literatura (Liu et al., 2005).

Figura 5: Protocolo de neurodiferenciação da linhagem celular SH-SY5Y. No dia -1, as células foram plaqueadas e cultivadas em meio de células contendo 10% de SBF. Após 24 h (dia 0), o meio de cultivo foi removido e adicionado novo meio de tratamento (MT) contendo 1% de SBF e dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, $10 \mu M$ (AR, controle positivo); composto TA8Amino ($0,014 \mu M$); TAHB3 ($0,71 \mu M$); donepezila ($0,0057 \mu M$); tacrina ($0,23 \mu M$). O meio de tratamento foi substituído a cada 2 dias e, após 8 dias de tratamento das células, estas foram coletadas e analisadas.

3.6. Avaliação de expressão proteica por *Western Blotting*

3.6.1. Extração de proteínas com solução de lise

Para a extração de proteínas após o ensaio de neurodiferenciação, foi utilizado o reagente *RIPA Lysis and Extraction Buffer* (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 112g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspensionado em solução de lise gelada (100µL/10⁶ células) com a adição de 1% de inibidor de proteases *Protease Inhibitor Cocktails* (Sigma). As células foram ressuspensionadas por agitação rápida durante 10 min em um agitador rotatório de 161g. Após esse processo, as células foram centrifugadas a 14.000g por 15 min a -4°C e o sobrenadante foi transferido para microtubos de centrifuga e armazenado em freezer -80°C. As proteínas foram quantificadas em um espectrofotômetro pela comparação com uma curva-padrão obtida para uma proteína controle (*Bovine Serum Albumin*) utilizando o kit BSA (Pierce).

3.6.2. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas foi realizada com a utilização do gel *NuPAGE Bis-Tris Gels* (Invitrogen). As amostras foram preparadas com 40 µg de proteínas que foram desnaturadas a 90°C por 5 min e, em seguida, aplicadas no gel de eletroforese. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific). A eletroforese foi realizada a 200V por 40 min em cuba (*XCell SureLock™ Mini-Cell* – Invitrogen). Após a eletroforese foi realizado a transferência das proteínas para uma membrana *Invitrolon PVDF* (Invitrogen) utilizando o sistema *XCell II™ Blot Module* (Invitrogen). A voltagem utilizada para a transferência foi de 30 V por cerca de 5 horas. Após esse tempo, a membrana foi lavada com água MilliQ (ultrapura) e armazenada.

3.6.3. Imunodetecção e visualização das proteínas

Com a utilização do kit *Western Breeze Chromogenic (Invitrogen)* foi realizado a imunodetecção e visualização das proteínas. Inicialmente, foi realizado o bloqueio da membrana com 10 mL de solução de bloqueio e incubada por 60 min em um agitador rotatório. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com 10mL de água *MilliQ* (ultrapura) durante 5 min e incubada com 4mL do anticorpo primário por cinco horas. Logo após, foram realizadas 4 lavagens de 5 min com 10mL de solução de lavagem *Wash Solution (Invitrogen)* e retirado o excesso da solução com duas lavagens de 10mL de água *MilliQ* (ultrapura) por 5 min. Dando sequência, a membrana foi então encubada com 4mL de solução de anticorpo secundário anti-rabbit ou anti-mouse (*Invitrogen*) por 30min, sendo em seguida novamente lavada quatro vezes por 5min com solução de lavagem e em seguida retirado o excesso com duas lavagens de 5min com água *MilliQ*. Por fim, as membranas foram secas em papel de filtro e armazenadas. Os anticorpos utilizados neste trabalho foram os seguintes: anti-mouse β -III-Tubulina (proporção 1:500 - *Santa Cruz Biotechnology*), anti-rabbit fosfo-PTEN_(Ser380/Thr382/383) (proporção 1:500 - *Cell Signaling Technology*). Anti-rabbit fosfo-Akt_(Ser473) (proporção 1:500 - *Cell Signaling Technology*), anti-rabbit COX2 (proporção 1:500 - *Cell Signaling Technology*), anti-rabbit SOD1 (proporção 1:500 - *Cell Signaling Technology*) e o endógeno anti-rabbit β -actina (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*) utilizado para o controle de normalização. Para visualização das proteínas, as membranas foram escaneadas utilizando um fotodocumentador *ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences)* e as bandas foram quantificadas utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*, sendo os valores relativos à quantificação normalizada em relação à proteína endógena.

3.7. Análise da cinética do ciclo celular

As alterações no ciclo celular foram observadas pelo uso do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio. As células foram semeadas em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço). Após 8 dias de diferenciação celular, o meio de cultura foi removido e

armazenado, as células então foram tripsinizadas e coletadas com o meio previamente guardado. As amostras foram então centrifugadas a 112g por 5 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células foi lavado com PBS e centrifugado novamente, e então resuspendido em 1mL de etanol 70% gelado, e armazenado a -20°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo. Após o processamento das amostras, as amostras foram novamente centrifugadas e o precipitado celular foi ressuspendido em 200 µL da solução de iodeto de propídio por 15 minutos em estufa de CO₂ a 37⁰ C; o material foi analisado no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System (Merck Millipore)* e o *Software Guava CytoSoft 4.2.1 (Guava Technologies)*, sendo contados 5.000 eventos para cada amostra.

3.8. Proliferação e viabilidade celular por citometria de fluxo

Para análise da curva de proliferação celular e viabilidade por citometria de fluxo foi utilizado o Kit *Guava ViaCount (Merck Millipore)*. Esse kit fornece determinações rápidas de viabilidade e contagem total de células presentes em uma amostra. Para o ensaio de proliferação celular foram semeadas 10⁵ células/poço em placas de 24 poços. Os tempos de colheita das células foram nos dias 0, 4,6 e 8. As células foram processadas e adicionado 200µL do kit e então determinou-se a proliferação celular a partir do calculo do índices de divisão celular, onde o número de células colhidas é dividido pelo número de células semeadas no dia 0. As amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System (Merck Millipore)* e o *Software Guava CytoSoft 4.2.1 (Guava Technologies)*, sendo contados 1.000 eventos para cada amostra.

3.9. Análise de geração de ROS

A geração de ROS intracelular é reconhecida pelo indicador de superóxido dihidroetidio (DHE-*Thermo Fisher Scientific*) citosólico, que exibe fluorescência azul em sua forma reduzida, entretanto, uma vez na presença de radicais livres ocorre sua oxidação em etídio, um intercalante de DNA que cora em vermelho fluorescente o núcleo da célula. Já a

geração de ROS mitocondrial é reconhecida pelo reagente *MitoSOX™ Red* (Thermo Fisher Scientific) que atua permeabilizando as células vivas, atingindo seletivamente as mitocôndrias. É rapidamente oxidado pelo superóxido, sendo que o produto oxidado torna-se altamente fluorescente após ligação ao ácido nucleico. Para esse ensaio, as células foram semeadas em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço) e realizado o ensaio de diferenciação celular. Ao final dos 8 dias de diferenciação, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 112g por 5min, o sobrenadante foi descartado e adicionados uma solução de 250μL de PBS e o reagente DHE (1,5 μM) e *MitoSox Red* (1,5 μM), seguido de incubação por 30 min para análise em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* (Merck Millipore) e, posteriormente, o *Software Guava CytoSoft 4.2.1* (Guava Technologies), sendo contados 5.000 eventos para cada amostra.

3.10. Quantificação de massa mitocondrial

MitoTracker Green é um marcador mitocondrial verde-fluorescente permeável às células vivas. O mesmo é utilizado para marcar mitocôndrias localizando-as independentemente do seu potencial de membrana. As células foram semeadas em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço) para análise de diferenciação celular. Ao final dos 8 dias de diferenciação, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 112g por 5min, o sobrenadante foi descartado e adicionados uma solução de 250μL de PBS e o reagente MitoTracker Green (50 nM, *Thermo Fisher Scientific*), seguido da incubação por 30 min para análise em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* (Merck Millipore) e, posteriormente, pelo *Software Guava CytoSoft 4.2.1* (Guava Technologies), sendo contados 5.000 eventos para cada amostra.

3.11. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi mensurada por citometria de fluxo como anteriormente descrito por Scheibye-Knudsen e colaboradores (2012). Este

ensaio baseia-se na capacidade de as membranas mitocondriais que estão saudáveis de manter uma diferença no potencial elétrico entre o interior e o exterior da organela, sendo este denominado potencial de membrana. A *tetrametilrhodamina* (TMRM-*Thermo Fisher Scientific*) é um corante vermelho-alaranjado que se acumula nas mitocôndrias que apresentam potencial de membrana normal, gerando um forte sinal. Quando há perda do potencial da membrana mitocondrial, o acúmulo de TMRM cessará e o sinal irá diminuir ou desaparecer. Nesse ensaio, as células foram semeadas em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço) e realizado o ensaio de diferenciação celular. Ao final dos 8 dias de diferenciação, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 112g por 5min, o sobrenadante foi descartado e adicionados uma solução de 250µL de PBS e o reagente TMRM (40nM), seguidos de incubação por 30 min para análise em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* (*Merck Millipore*) e pelo *Software Guava CytoSoft 4.2.1* (*Guava Technologies*), sendo contados 5.000 eventos para cada amostra.

3.12 Análise de morte celular

A análise de morte celular foi realizada com a Anexina V, uma proteína de ligação à fosfatidilserina (PS), a qual interage forte e especificamente com os resíduos deste fosfolípido gerando uma fluorescência verde. As células foram semeadas em placas de 12 poços (6×10^4 células/poço) o tratamento foi realizado de acordo com protocolo anteriormente descrito de neuroproteção. As células foram coletadas e centrifugadas a 112g por 5min, o sobrenadante foi descartado e adicionado o reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*) por 30 min, sendo avaliado por meio de citometria de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e analisado no *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os resultados foram apresentados como porcentagens de células positivas para Anexina-V.

3.13. Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média e desvio padrão. Para a análise dos resultados foi empregado o teste *One Way ANOVA* e, posteriormente, foi utilizado o pós-teste adequado para cada análise; apenas para o ensaio de *Western Blotting* foi utilizado o teste *t*, sendo $\alpha < 0,05$ o valor considerado como significativo, usando-se o programa *Prism v. 5.0 (GraphPad software)*, sendo que os gráficos foram construídos no mesmo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de Citotoxicidade e Hepatotoxicidade

Inicialmente, foram realizados testes de viabilidade celular nos tempos de 24, 48, 72 e 120 horas e em várias concentrações, acima e abaixo do IC_{50} de inibição da AChE, dos compostos híbridos de donepezila e tacrina (TA8Amino e TAHB3). Os experimentos foram realizados em células SH-SY5Y, modelo utilizado para estudo *in vitro* da DA, e em células da linhagem HepG2, esta última para avaliação da hepatotoxicidade dessas drogas. As drogas donepezila e tacrina foram utilizadas isoladamente como controle, em concentrações próximas ao IC_{50} da inibição da AChE (0,0057 μ M e 0,23 μ M, respectivamente), uma vez que os compostos híbridos foram sintetizados com base na estrutura química de ambas as drogas.

Em células SH-SY5Y, as concentrações testadas dos compostos TA8Amino e TAHB3 não demonstraram efeitos citotóxicos significativos nos testes de viabilidade celular nos tempos avaliados de 24 a 120 horas em comparação ao controle negativo (DMSO) (**Figura 6 e 7, Tabela 2**). Ao contrário, a doxorrubicina (utilizada como controle positivo, 0,17 μ M) se apresentou citotóxica nas mesmas condições avaliadas.

Figura 6: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TA8Amino na linhagem celular SH-SY5H após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Figura 7: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TAHB3 na linhagem celular SH-SY5H após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 2: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações dos inibidores de AChE (TA8Amino e TAHB3) avaliadas nos tempos de 24, 48, 72 e 120 horas na linhagem SH-SY5Y. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Compostos	Concentrações (μ M)	Viabilidade celular (%) ($\pm$ Desvio Padrão)			
		Tempo (horas)			
		24	48	72	120
DMSO		100,0 $\pm$ 3***	100,0 $\pm$ 2,9***	100,0 $\pm$ 5,8***	100,0 $\pm$ 8,7***
Doxorrubicina	0,00018	38,3 $\pm$ 19,5	21,9 $\pm$ 4,2	8,4 $\pm$ 4,5	19,9 $\pm$ 11,1
TA8Amino	0,0035	84,7 $\pm$ 10,5	98,9 $\pm$ 7,2	85,3 $\pm$ 15,5	81,8 $\pm$ 11,4
	0,007	84,0 $\pm$ 12,4	97,8 $\pm$ 12,5	90,1 $\pm$ 6,8	93,0 $\pm$ 11,9
	0,014	88,9 $\pm$ 8,5	103,3 $\pm$ 10,9	91,5 $\pm$ 2,0	91,2 $\pm$ 7,1
	0,028	88,6 $\pm$ 10,1	102,1 $\pm$ 6,3	83 $\pm$ 5,0	86,4 $\pm$ 6,9
	0,056	95,7 $\pm$ 7	98,9 $\pm$ 5,8	99,2 $\pm$ 8,8	91,5 $\pm$ 1,0
	0,112	106,9 $\pm$ 16,1	97 $\pm$ 7,9	97,6 $\pm$ 0,7	94,8 $\pm$ 6,4
	0,09	101,7 $\pm$ 4,8	95,5 $\pm$ 9,5	96,4 $\pm$ 8,7	93,2 $\pm$ 10,0
TAHB3	0,18	99,6 $\pm$ 9,6	90,0 $\pm$ 9,9	88,5 $\pm$ 12,7	90,5 $\pm$ 13,2
	0,35	103,7 $\pm$ 4,9	101,4 $\pm$ 13,7	81,6 $\pm$ 8,8	88,2 $\pm$ 4,0
	0,71	96,7 $\pm$ 10,4	87,0 $\pm$ 21,0	85 $\pm$ 14,9	87,2 $\pm$ 5,6
	1,42	98,5 $\pm$ 3,7	82,1 $\pm$ 1,4	87,7 $\pm$ 0,2	92,4 $\pm$ 11,9
	2,84	102,5 $\pm$ 3,3	88,8 $\pm$ 3,8	93,7 $\pm$ 5,3	91,7 $\pm$ 10,7
Donepezila	0,0057	109,5 $\pm$ 4,4	96,8 $\pm$ 3,9	100,8 $\pm$ 4,3	88,0 $\pm$ 3,7
Tacrina	0,23	97,8 $\pm$ 13	96,2 $\pm$ 6,2	96,6 $\pm$ 2,4	87,1 $\pm$ 11,4

*** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo.

Com relação à avaliação de hepatotoxicidade na linhagem hepática HepG2, o composto híbrido TA8Amino não induziu alterações significativas na viabilidade celular em todos os tempos estudados (**Figura 8, Tabela 3**) em comparação ao controle com DMSO. O composto híbrido TAHB3 mostrou efeito hepatotóxico apenas na maior concentração (2,84 μ M) testada no tempo de 24 h, sendo este equivalente a uma redução de 16,4% da viabilidade celular; entretanto, após 48 horas foi observada uma recuperação da viabilidade celular, que se manteve até o tempo de 120 horas (**Figura 9, Tabela 3**). Ao contrário, a doxorrubicina (controle positivo) se apresentou altamente citotóxica nos tempos de 24 e 48 h, mas houve uma recuperação da viabilidade em 72 e 120 h.

Esses dados indicam um menor efeito citotóxico dos compostos híbridos (sobretudo de TA8Amino) relativamente aos compostos donepezila ou tacrina, testados isoladamente, sendo que os demais ensaios (resultados descritos a seguir) foram realizados nas concentrações de IC₅₀ relativa à inibição da AChE pelos compostos.

Figura 8: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TA8Amino na linhagem celular HepG2 após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média ± DP. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 µM); donepezila (0,0057 µM); tacrina (0,23 µM).

Figura 9: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações do composto TAHB3 na linhagem celular HepG2 após 24, 48, 72 e 120 horas de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio XTT. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média ± DP. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%); DO: doxorubicina (controle positivo, 0,17 µM); donepezila (0,0057 µM); tacrina (0,23 µM).

Tabela 3: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações dos inibidores de AChE (TA8Amino e TAHB3) avaliadas nos tempos de 24, 48, 72 e 120 horas na linhagem HepG2. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Compostos	Concentrações (μ M)	Viabilidade celular (%) ($\pm$ Desvio Padrão)			
		Tempo (horas)			
		24	48	72	120
DMSO		100,0 $\pm$ 7,3***	100,0 $\pm$ 5,8***	100,0 $\pm$ 9,5***	100,0 $\pm$ 3,5***
Doxorrubicina	0,00018	22,9 $\pm$ 2,1	13,3 $\pm$ 8,3	55,8 $\pm$ 7,0	52,3 $\pm$ 6,2
TA8Amino	0,0035	100,6 $\pm$ 11,3	99,4 $\pm$ 5,6	87,4 $\pm$ 11,5	96,8 $\pm$ 5,8
	0,007	98,2 $\pm$ 9,7	97,2 $\pm$ 0,8	88,8 $\pm$ 5,7	101,0 $\pm$ 6,6
	0,014	98,1 $\pm$ 11,1	96,2 $\pm$ 2,3	89,5 $\pm$ 2,5	97,8 $\pm$ 13,4
	0,028	87,4 $\pm$ 5,4	97,4 $\pm$ 2,0	89,8 $\pm$ 6,6	107,5 $\pm$ 7,0
	0,056	84,8 $\pm$ 4,7	94,0 $\pm$ 1,8	84,1 $\pm$ 15,9	102,8 $\pm$ 9,4
	0,112	87,5 $\pm$ 6,2	89,3 $\pm$ 9,7	88,6 $\pm$ 5,6	96,9 $\pm$ 12,4
	0,09	104,7 $\pm$ 6,2	95,2 $\pm$ 5,5	87,8 $\pm$ 8,7	101,3 $\pm$ 12,8
TAHB3	0,18	104,2 $\pm$ 2,9	97,4 $\pm$ 2,6	76,7 $\pm$ 6,5	90,7 $\pm$ 3,6
	0,35	99,5 $\pm$ 3,6	97,0 $\pm$ 7,2	87,5 $\pm$ 12,9	100,2 $\pm$ 7,3
	0,71	98,7 $\pm$ 6,4	99,8 $\pm$ 2,3	91,8 $\pm$ 9,4	101,7 $\pm$ 4,6
	1,42	92,2 $\pm$ 4,7	91,0 $\pm$ 5,5	81,6 $\pm$ 14	100,5 $\pm$ 9,5
	2,84	83,6 $\pm$ 6,4*	96,8 $\pm$ 7,9	85,3 $\pm$ 4,7	102,7 $\pm$ 5,9
Donepezila	0,0057	88,4 $\pm$ 10	104,3 $\pm$ 12,7	89,1 $\pm$ 5,1	98,2 $\pm$ 14,5
Tacrina	0,23	95,2 $\pm$ 5,6	97,6 $\pm$ 2,7	92,7 $\pm$ 12,8	96,5 $\pm$ 9,0

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo.

4.2. Ensaios de diferenciação neuronal induzidos pelos AChEI

4.2.1. Análise de neurodiferenciação e alterações morfológicas

Para a análise de neurodiferenciação foram utilizadas as concentrações de IC₅₀ de inibição da AChE para ambos os compostos, sendo utilizado o ácido retinoico (AR, 10 μ M) como controle positivo de diferenciação celular. Na análise morfológica do ensaio de neurodiferenciação observou-se que ambos os compostos híbridos utilizados foram capazes de induzir a neurodiferenciação, o que não foi observado no controle negativo (DMSO). Foram observadas alterações morfológicas, tais como o aumento das projeções de neuritos, diminuição do tamanho do citoplasma e do número de células no campo visual; além disso,

notou-se a formação de pontos de redes de interconexões entre neurônios maduros, principalmente no grupo diferenciado por AR e TA8Amino após 8 dias, sendo tais características condizentes com a diferenciação em neurônios (**Figura 10 e 11**). Entretanto, as células tratadas somente com donepezila ou com tacrina, não apresentaram alterações morfológicas significativas em comparação às células tratadas com os compostos híbridos.

Figura 10: Células da linhagem celular SH-SY5Y após 8 dias de tratamento com os compostos híbridos e controles. As alterações morfológicas e a neurodiferenciação (setas indicam formação de neuritos) são observadas sob ampliação de 20x utilizando microscópio invertido (*Carl Zeiss*). Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinoico, 10 µM (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 µM); TAHB3 (0,71 µM); donepezila (0,0057 µM); tacrina (0,23 µM).

Figura 11: Células SH-SY5Y apresentando redes de interconexões (círculos pontilhados) entre neurônios maduros diferenciados após 8 dias de tratamento com AR 10 μM **(A)** e TA8Amino 0,014 μM **(B)**; ampliação de 20x utilizando microscópio invertido (*Carl Zeiss*).

4.2.2. Quantificação das células neurodiferenciadas e comprimento de neuritos

Foi realizada a quantificação de células diferenciadas em neurônios maduros nas culturas tratadas com os compostos testados; estes foram capazes de induzir neurodiferenciação quando comparados ao controle negativo que apresentou 13% de células neurodiferenciadas, enquanto que o AR foi capaz de diferenciar 100% das células, conforme esperado. A TA8Amino induziu neurodiferenciação de 55%, enquanto que TAHB3 induziu 43%, demonstrando uma diferença significativa entre os dois compostos. Quanto às drogas donepezila e tacrina testadas individualmente, estas induziram uma diferenciação de 33 e 38%, respectivamente **(Figura 12A, Tabela 4)**. Deste modo, esses dados demonstram que o composto TA8Amino possui um maior potencial de neurodiferenciação quando comparado ao demais inibidores de AChE analisados.

Em sequência, todos os compostos testados levaram a um aumento do tamanho dos neuritos formados após a neurodiferenciação, comparado ao controle negativo. O tamanho dos neuritos observado para o controle negativo foi equivalente à média basal de 21,9 μm , enquanto que nas células tratadas com AR, o comprimento médio foi equivalente a 73,4 μm ; para os compostos híbridos TA8Amino e TAHB3, foram observados valores de 37,4 e 32,7 μm , respectivamente, os quais foram superiores aos encontrados para as drogas donepezila e tacrina, 31,5 e 30,6 μm , respectivamente **(Figura 12B, Tabela 4)**. Esses dados indicam que ambos os compostos híbridos avaliados apresentaram a capacidade de induzir aumento no comprimento dos neuritos.

(A)

(B)

Figura 12: Porcentagens de células neurodiferenciadas na linhagem celular SH-SY5Y **(A)** Foram consideradas células neurodiferenciadas aquelas que exibiam extensão de pelo menos um neurito apresentando um comprimento superior ao diâmetro do corpo celular. **(B)** Comprimento dos neuritos avaliados pelo *software ImageJ (Fiji)* em 100 células analisadas aleatoriamente. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo ou entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 4: Porcentagem de células neurodiferenciadas e comprimento de neuritos em micrômetro (μm) na linhagem SH-SY5Y após 8 dias de diferenciação. Aplicou-se o teste estatístico *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

	Grupos de Tratamento ($\pm$ desvio padrão)					
	DMSO	AR	TA8Amino	TAHB3	Donepezila	Tacrina
Células Diferenciadas (%)	13,0 $\pm$ 2,5	100,0 $\pm$ 0,0***	55,0 $\pm$ 5,0***	43,0 $\pm$ 4,6***	33,0 $\pm$ 5,3***	38,0 $\pm$ 1,5***
Comprimento de Neuritos (μm)	21,9 $\pm$ 2,3	73,4 $\pm$ 16,1***	37,4 $\pm$ 3,2**	32,4 $\pm$ 1,7**	31,5 $\pm$ 0,5**	30,6 $\pm$ 1,25**

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao controle negativo.

4.2.3. Expressão proteica do marcador de neurônio β -III-Tubulina

A confirmação da indução de neurodiferenciação foi realizada pela quantificação da expressão proteica do marcador β -III-Tubulina nas células analisadas após o período de 8 dias (ensaio de neurodiferenciação). O AR induziu um aumento de 51% no nível de expressão da proteína β -III-Tubulina em comparação às células indiferenciadas no controle negativo (DMSO 0,1%), como esperado. O composto TA8Amino induziu um aumento de aproximadamente 75% na expressão do marcador de neurodiferenciação β -III-Tubulina, comparado ao controle negativo. Apesar do aumento de aproximadamente 47% na expressão da proteína β -III-Tubulina para o composto TAHB3, este não foi significativo em relação ao controle negativo. Quanto aos demais tratamentos com donepezila ou tacrina, estes não foram capazes de induzir um aumento significativo na expressão dessa proteína (**Figura 13 e 14, Tabela 5**), o que é compatível com os resultados obtidos anteriormente. Tais dados comprovam que o composto híbrido TA8Amino é capaz de induzir a neurodiferenciação.

Figura 13: Expressão da proteína β -III-Tubulina (~55kDa) e β -actina (~45kDa) analisada por *Western Blotting* após a neurodiferenciação por 8 dias na linhagem SH-SY5Y. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Figura 14: Níveis de expressão da proteína β -III-Tubulina após a neurodiferenciação das células SH-SY5Y submetidas a tratamentos com os compostos AChEI. Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina, utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. A análise estatística foi realizada pelo teste *t*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo (DMSO). Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 5: Níveis de expressão da proteína β -III-Tubulina após a neurodiferenciação na linhagem SH-SY5Y. Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina, utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0* (Lite Software). Análise estatística realizada pelo teste *t*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Proteína	Expressão Relativa (normalizada com β -actina)					
	Grupos de Tratamento ($\pm$ desvio padrão)					
	DMSO	AR	TA8Amino	TAHB3	Donepezila	Tacrina
β -III-Tubulina	1,00 $\pm$ 0,38	1,51 $\pm$ 0,19*	1,75 $\pm$ 0,07**	1,47 $\pm$ 0,42	1,05 $\pm$ 0,38	1,06 $\pm$ 0,32

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao controle negativo.

4.2.4. Análise das alterações da cinética do ciclo celular nas células neurodiferenciadas pelos AChEI

Observou-se que nenhum dos tratamentos realizados com os compostos híbridos, inclusive com AR, donepezila e tacrina, foi capaz de causar alterações significativas na distribuição das células nas fases do ciclo celular nas condições de tratamento testadas (**Figura 15, Tabela 6**), evidenciando a ausência de efeitos dos compostos híbridos na cinética de proliferação das células, da mesma forma que os demais compostos.

Figura 15: Cinética do ciclo celular após 8 dias de neurodiferenciação na linhagem SH-SY5Y. A análise do ciclo celular de células diferenciadas foi realizada pela detecção e classificação de células com diferentes perfis de IP incorporado (citometria de fluxo). Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 6: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo após 8 dias de neurodiferenciação na linhagem celular SH-SY5Y. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Distribuição de células nas fases do ciclo celular (%) ($\pm$ Desvio Padrão)				
Tratamentos	Fases do ciclo celular			
	Sub G1	G1	S	G2/M
DMSO	1,6 $\pm$ 0,5	70,4 $\pm$ 1,8	17,8 $\pm$ 1,2	10,5 $\pm$ 1,0
RA	2,0 $\pm$ 0,8	70,7 $\pm$ 2,3	16,6 $\pm$ 2,3	11,1 $\pm$ 0,1
TA8Amino	1,3 $\pm$ 0,5	70,3 $\pm$ 1,5	18,3 $\pm$ 1,1	10,4 $\pm$ 0,6
TAHB3	1,3 $\pm$ 0,2	67,9 $\pm$ 1,1	20,7 $\pm$ 2,2	10,4 $\pm$ 1,0
Donepezila	1,4 $\pm$ 0,1	67,2 $\pm$ 1,7	19,4 $\pm$ 2,5	11,7 $\pm$ 0,7
Tacrina	1,7 $\pm$ 0,2	67,8 $\pm$ 1,2	23,0 $\pm$ 2,4	9,0 $\pm$ 1,5

4.2.5. Curva de proliferação celular durante os 8 dias de neurodiferenciação induzida pelos AChEI

A capacidade de proliferação celular em resposta aos compostos foi analisada durante a neurodiferenciação, sendo contados os números totais de células viáveis e calculados os números de duplicações celulares nos dias 2, 6 e 8 para os diferentes tratamentos. Conforme esperado, o controle positivo AR demonstrou uma diminuição no número de duplicações celulares após a diferenciação em neurônios maduros. Entretanto, foi observado que apenas o composto TA8amino (no dia 2) induziu um aumento significativo no número de duplicações celulares que, ao longo dos 8 dias de neurodiferenciação, se tornou semelhante ao controle negativo (DMSO). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em comparação ao controle negativo (**Figura 16, Tabela 7**).

Figura 16: Proliferação celular em resposta aos tratamentos com os compostos, analisada por citometria de fluxo, durante a neurodiferenciação para determinação do número de células viáveis por meio do kit de viabilidade celular *Kit Guava ViaCount* (Merk Millipore). Análise estatística: *One-Way Anova*, pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando os resultados foram comparados ao controle negativo ou entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 7: Proliferação celular durante 8 dias de neurodiferenciação na linhagem celular SH-SY5Y. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Nº de duplicações celulares						
Dias	Tratamentos					
	DMSO	AR	TA8Amino	TAHB3	Donepezila	Tacrina
2	1,56 $\pm$ 0,33	0,31 $\pm$ 0,28	4,81 $\pm$ 1,0*	3,22 $\pm$ 1,73	3,16 $\pm$ 2,0	4,12 $\pm$ 0,60
6	7,09 $\pm$ 3,0	1,05 $\pm$ 0,36*	7,3 $\pm$ 0,82	6,03 $\pm$ 3,65	8,44 $\pm$ 2,3	7,44 $\pm$ 4,4
8	12,35 $\pm$ 1,06	0,61 $\pm$ 0,13**	11,85 $\pm$ 4,54	6,95 $\pm$ 4,25	10,26 $\pm$ 3,58	6,46 $\pm$ 2,9

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo.

4.2.6. Efeitos dos tratamentos com os compostos sobre os parâmetros mitocondriais nas células submetidas à neurodiferenciação

A avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros mitocondriais foi realizada ao final de 8 dias de neurodiferenciação na linhagem celular SH-SY5Y. Para a avaliação de ROS intracelular observou-se que o tratamento com AR levou a um aumento de 62,74% na produção de ROS intracelular, a partir do radical superóxido, em relação ao controle negativo (DMSO 0,1%), conforme esperado. Em relação aos tratamentos com os inibidores da AChE, apenas TA8Amino foi capaz de induzir uma maior produção de ROS intracelular no ensaio de neurodiferenciação, levando a um aumento de 48,27% quando comparado com o controle negativo (**Figura 17A e B, Tabela 8**).

A avaliação da produção de ROS mitocondrial (radical superóxido) indicou que o composto TA8Amino induziu um aumento significativo de 67,60% na produção de ROS comparado ao controle negativo (DMSO 0,1%). Por outro lado, foi observada uma diminuição na produção de ROS mitocondrial nos tratamentos com cada uma das drogas, AR, donepezila e tacrina, correspondente a 56,44, 56,95 e 67,15%, respectivamente. Ao contrário, o composto TAHB3 não induziu alterações em comparação ao controle negativo (**Figura 18A e B, Tabela 8**).

Figura 17: A produção de ROS intracelular foi mensurada pela marcação com o corante *Dihydroethidium* (DHE-1,5 μ M). **(A)** Histograma da intensidade de fluorescência de DHE **(B)** Gráfico representativo da fluorescência média de DHE em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Figura 18: Produção de ROS mitocondrial mensurada pela marcação com o corante *MitoSox red* (1,5 μ M). **(A)** Histograma da intensidade de fluorescência de *MitoSox red* **(B)** Gráfico representativo da fluorescência média de *MitoSox red* em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

A análise do potencial de membrana mitocondrial indicou que apenas o AR foi capaz de induzir alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial das células após 8 dias de neurodiferenciação. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado em comparação com o controle negativo sendo observado que o tratamento com o AR levou a uma diminuição de 60,21% no potencial em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%). Para os demais compostos inibidores da AChE não foram observadas alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial (**Figura 19A e B, Tabela 8**).

Com relação ao aumento da massa mitocondrial, esta é uma das características essenciais para a diferenciação neuronal, sendo esse aumento (150,43%) observado de forma significativa apenas no tratamento com AR quando comparado ao controle negativo (DMSO 0,1%), o que já era esperado para este composto, devido à sua capacidade de induzir diferenciação neuronal em todas as células analisadas (**Figura 20A e B, Tabela 8**).

Figura 19: Potencial de membrana mitocondrial avaliado pela marcação com o corante TMRM (*Tetramethylrhodamine* - 40 nM). **(A)** Histograma da intensidade de fluorescência de TMRM **(B)** Gráfico representativo da fluorescência média de TMRM em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way* Anova com pós teste Newman-Keuls. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Figura 20: Massa mitocondrial avaliada pela marcação com o corante *Mitotraker green* (50 μ M). **(A)** Histograma da intensidade de fluorescência de *Mitotraker green* **(B)** Gráfico representativo da fluorescência média de *Mitotraker green* em unidade arbitrária (U.A.). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 8: Avaliação dos parâmetros mitocondriais após 8 dias de neurodiferenciação e tratamento com os compostos. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Newman-Keuls*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros mitocondriais	Intensidade média de fluorescência (U.A.) ($\pm$ Desvio Padrão) para os diferentes grupos de tratamento com as drogas					
	DMSO	AR	TA8Amino	TAHB3	Donepezila	Tacrina
DHE	15,57 $\pm$ 1,2	25,34 $\pm$ 2,36**	23,08 $\pm$ 6,9	17,8 $\pm$ 5,06	17,99 $\pm$ 4,22	19,74 $\pm$ 5,61
MitoSox Red	259,25 $\pm$ 13,93	112,92 $\pm$ 28,16*	434,51 $\pm$ 91,92*	202,6 $\pm$ 21,6	111,59 $\pm$ 24,06*	98,12 $\pm$ 5,24*
TMRM	132,54 $\pm$ 24,29	331,92 $\pm$ 44,58*	174,83 $\pm$ 13,05	191,6 $\pm$ 42,77	188,93 $\pm$ 56,41	217,95 $\pm$ 107
Mitotracker Green	214,23 $\pm$ 46,40	85,24 $\pm$ 15,0*	187,92 $\pm$ 38,75	286 $\pm$ 34,48	263,92 $\pm$ 26,91	265,68 $\pm$ 82,51

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo.

4.2.7. Avaliação da expressão proteica de PTEN_(Ser380/Thr382/383), Akt_(Ser473), COX2 e SOD1

Avaliou-se a expressão de proteínas (*Western Blotting*) envolvidas na via de sinalização PTEN/AKT/COX2 e de estresse oxidativo (SOD1) após 8 dias de diferenciação neuronal com os AChEI na linhagem SH-SY5Y. Observou-se um aumento significativo na expressão de PTEN fosforilada nos resíduos de serina 380, Treonina 382 e 383, sob tratamento com os compostos híbridos, TA8amino (~164%) e TAHB3 (~157%), assim como, por donepezila (~163%) e tacrina (~58%) em comparação ao controle negativo (DMSO 0,1%). Foi observado aumento significativo nos níveis de AKT fosforilada no resíduo de serina 473, induzido por TA8Amino (~90%), havendo apenas uma tendência a aumento de AKT nos demais tratamentos. COX2 teve seu nível de expressão proteica induzido de forma significativa pelo AR (~74%) e compostos AChEI TA8Amino (~169%), TAHB3 (~155%), donepezila (~120%) e tacrina (~100%) quando comparados ao controle negativo. Esses dados indicam uma indução na via de sinalização de PTEN/AKT/COX2 levando possivelmente à diferenciação celular, demonstrando o potencial desses compostos na indução de neurodiferenciação. Quando se avaliou a expressão da proteína SOD1 pode-se observar um aumento significativo de sua indução pelo AR (~38%) e compostos híbridos, TA8amino

(~78%) e TAHB3 (~74%) (Figuras 21 e 22, tabela 9), demonstrando um aumento na atividade antioxidante induzida pelos mesmos.

Figura 21: Expressão da proteína Fosfo-PTEN_(Ser380/Thr382/383) (~54kDa), Fosfo-Akt_(Ser473) (~60kDa), COX2 (~69KDa), SOD1 (~18kDa) e β-actina (~45kDa) analisada por *Western Blotting* após a neurodiferenciação por 8 dias na linhagem SH-SY5Y. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μM (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μM); TAHB3 (0,71 μM); donepezila (0,0057 μM); tacrina (0,23 μM).

Figura 22: Expressão proteica avaliada após a neurodiferenciação das células SH-SY5Y submetidas a tratamentos com os compostos AChEI. **(A)** Expressão proteica de Fosfo-PTEN_(Ser380/Thr382/383) (~54kDa); **(B)** Fosfo-Akt_(Ser473) (~60kDa); **(C)** COX2 (~69kDa); **(D)** SOD1 (~18kDa). Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina (~45kDa), utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Teste *t* foi utilizado para as análises estatísticas. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo. Dimetilsulfóxido, 0,1% (DMSO, controle negativo); ácido retinóico, 10 μ M (AR, controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 9: Níveis de expressão proteica avaliadas após 8 dias de neurodiferenciação das células SH-SY5Y submetidas a tratamentos com os compostos AChEI. Fosfo-PTEN_(Ser380/Thr382/383) (~54kDa), Fosfo-Akt_(Ser473) (~60kDa), COX2 (~69kDa), SOD1 (~18kDa) analisada por *Western Blotting*. Os valores foram normalizados com a proteína endógena β -actina (~45kDa), utilizando o programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Análise estatística realizada pelo teste *t*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Proteínas	Expressão relativa (normalizada com β -actina)					
	Grupos de Tratamento ($\pm$ desvio padrão)					
	DMSO	AR	TA8Amino	TAHB3	Donepezila	Tacrina
Fosfo-PTEN (Ser380/Thr382/383)	1 $\pm$ 0,0	1,65 $\pm$ 0,77	2,64 $\pm$ 1,19*	2,57 $\pm$ 1,14*	2,63 $\pm$ 0,92*	1,58 $\pm$ 0,39*
Fosfo-Akt (Ser473)	1 $\pm$ 0,0	1,30 $\pm$ 0,48	1,90 $\pm$ 0,60*	1,68 $\pm$ 0,58	1,93 $\pm$ 0,85	1,50 $\pm$ 0,77
COX2	1 $\pm$ 0,0	1,73 $\pm$ 0,34*	2,69 $\pm$ 0,93*	2,55 $\pm$ 0,87*	2,20 $\pm$ 0,18***	2,00 $\pm$ 0,43*
SOD1	1 $\pm$ 0,0	1,37 $\pm$ 0,10**	1,78 $\pm$ 0,52*	1,74 $\pm$ 0,74**	1,22 $\pm$ 0,17	1,20 $\pm$ 0,58

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo.

4.3. Ensaios de neuroproteção frente a danos oxidativos e neurotóxicos induzidos pelo H_2O_2 e pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$

4.3.1 Viabilidade celular

Com o intuito de verificar a capacidade neuroprotetora dos compostos TA8Amino e TAHB3, assim como donepezila e tacrina, foi realizado um pré-tratamento com as moléculas AChEI por 24h e, em sequência, o meio foi retirado e adicionado o tratamento com o peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ por 24 horas ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 4 h, sendo as células avaliadas após 5 dias. Observou-se que o tratamento com o indutor de dano oxidativo (H_2O_2) reduziu significativamente (66,46%) a viabilidade celular em comparação ao controle positivo (DMSO 0,1%). Os tratamentos com TAHB3, donepezila e tacrina realizados com o pós-tratamento com H_2O_2 causaram uma redução significativa da viabilidade, 64,46%, 66,76% e 75,05%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo; assim, não foram observados efeitos neuroprotetores dos compostos quando comparados ao controle

positivo. Entretanto, apenas as células tratadas com o composto teste TA8Amino mais o indutor de dano H_2O_2 não apresentaram diferenças significativas em comparação aos controles negativo e positivo. Os demais tratamentos com apenas os compostos teste TA8Amino e TAHB3, como também donepezila e tacrina, isoladamente, não demonstram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, como observado anteriormente (Figura 23, Tabela 10).

Figura 23: Porcentagem de células viáveis após ensaio de neuroproteção frente aos danos por estresse oxidativo induzidos pelo H_2O_2 (100 μM), analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount* (Merck Millipore). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (H_2O_2). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μM (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μM); TAHB3 (0,71 μM); donepezila (0,0057 μM); tacrina (0,23 μM).

Tabela 10: Avaliação da viabilidade celular do ensaio de neuroproteção frente aos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 (100 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount* (Merck Millipore). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Citotoxicidade ($\pm$ Desvio Padrão)	
Grupos de Tratamentos	Viabilidade celular (%)
DMSO	100 $\pm$ 13,20
H_2O_2	33,53 $\pm$ 4,04*
TA8Amino	105,05 $\pm$ 30,19 [#]
TA8Amino + H_2O_2	64,40 $\pm$ 28,58
TAHB3	83,75 $\pm$ 7,74
TAHB3 + H_2O_2	35,53 $\pm$ 6,87*
Donepezila	87,54 $\pm$ 25,26 [#]
Donepezila + H_2O_2	33,23 $\pm$ 11,83*
Tacrina	93,50 $\pm$ 2,97 [#]
Tacrina + H_2O_2	24,95 $\pm$ 7,14**

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (H_2O_2).

Quanto ao ensaio de neuroproteção em resposta ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ (controle positivo), foi observado que o tratamento com o peptídeo reduziu a viabilidade celular em 71,26% quando comparado ao controle negativo (DMSO 0,1%). Os compostos donepezila ou tacrina combinados ao peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ não demonstraram alterações significativas relativamente aos controles negativo e positivo, havendo uma redução da viabilidade celular de 30 e 24%, respectivamente, demonstrando não haver efeitos protetores frente ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$. Por outro lado, os compostos TA8Amino e TAHB3 demonstraram efeitos neuroprotetores frente aos danos induzidos pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$, levando a uma proteção de 91,93 e 54,68% quando comparados ao controle positivo. Quanto aos demais tratamentos com cada um dos compostos-teste TA8Amino e TAHB3, como também donepezila e tacrina, isoladamente, estes não mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, como observado anteriormente (**Figura 24, Tabela 11**). Estes dados demonstram um grande potencial de ambos os novos compostos híbridos no sentido de proteger as células neuronais SH-SY5Y em face aos danos neurotóxicos induzidos pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$.

Figura 24: Porcentagem de células viáveis após ensaio de neuroproteção frente aos danos neurotóxicos induzidos pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ (25 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount* (Merck Millipore). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo ($A\beta_{(1-42)}$). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μ M (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μ M); TAHB3 (0,71 μ M); donepezila (0,0057 μ M); tacrina (0,23 μ M).

Tabela 11: Avaliação da viabilidade celular do ensaio de neuroproteção frente aos danos neurotóxicos induzidos pelo peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ (25 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o *Kit Guava ViaCount* (Merck Millipore). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Citotoxicidade ($\pm$ Desvio Padrão)	
Grupos de Tratamentos	Viabilidade celular (%)
DMSO	100 $\pm$ 10,98
A β (25 μ M)	28,74 $\pm$ 5,77**
TA8Amino	108,48 $\pm$ 0,59##
TA8Amino + A β	120,67 $\pm$ 3,21###
TAHB3	89,36 $\pm$ 4,91##
TAHB3 + A β	83,42 $\pm$ 18,37#
Donepezila	96,26 $\pm$ 30,45#
Donepezila + A β	69,62 $\pm$ 14,07
Tacrina	73,45 $\pm$ 10,17
Tacrina + A β	75,89 $\pm$ 16,85

** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significantes em comparação ao controle negativo e ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo ($A\beta_{(1-42)}$).

4.3.2. Indução de morte celular

Assim como nos ensaio de viabilidade celular a detecção de morte celular por apoptose foi avaliada após o pré-tratamento com os AChEI por 24h, em sequência, o tratamento com o peptídeo A $\beta_{(1-42)}$ por 24 horas ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 4 h, sendo as análises processadas após 5 dias. Para os grupos tratados com o H₂O₂, foi observado que todos os compostos testados levaram a um aumento da porcentagem de células apoptóticas quando comparados ao controle negativo; entretanto, apenas tacrina induziu um aumento significativo de 7,4% quando comparado ao controle positivo (H₂O₂). Por outro lado, apenas o composto TA8Amino, isoladamente, induziu diferença significativa em relação ao controle positivo. Os tratamentos com os compostos isolados TAHB3, donepezila e tacrina não apresentaram diferenças significativas na comparação com os controles positivo e negativo (**Figura 25, Tabela 12**). Não foram observadas alterações significativas quanto à indução de células necróticas (**Tabela 12**).

Figura 25: Porcentagem de células apoptóticas (células positivas para anexina V) após ensaio de neuroproteção frente ao dano por estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ (100µM); os resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin* (Guava Technologies). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (H₂O₂). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 µM (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 µM); TAHB3 (0,71 µM); donepezila (0,0057 µM); tacrina (0,23 µM).

Tabela 12: Porcentagem de células apoptóticas e necróticas observado após o ensaio de neuroproteção frente ao dano oxidativo induzido pelo H_2O_2 (100 μ M) analisados por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*) quantificando as células positivas para anexina V e 7-AAD. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Grupos de Tratamentos	Morte celular ($\pm$ Desvio Padrão)	
	Células Apoptóticas (%) Anexina V positivas	Células Necróticas (%) 7-AAD positivas
DMSO	11 $\pm$ 0,64	10,73 $\pm$ 0,94
H_2O_2	18,36 $\pm$ 2,51*	11,6 $\pm$ 2,06
TA8Amino	11,06 $\pm$ 2,07 [#]	21,13 $\pm$ 15,83
TA8Amino + H_2O_2	19,6 $\pm$ 2,70*	13,2 $\pm$ 2,70
TAHB3	12,66 $\pm$ 2,63	13,1 $\pm$ 2,08
TAHB3 + H_2O_2	22,7 $\pm$ 2,78***	15,43 $\pm$ 3,72
Donepezila	12,93 $\pm$ 5,23	11,13 $\pm$ 3,47
Donepezila + H_2O_2	23,46 $\pm$ 2,00**	15,26 $\pm$ 3,5
Tacrina	13,9 $\pm$ 4,47 [#]	11,16 $\pm$ 2,5
Tacrina + H_2O_2	25,76 $\pm$ 1,59***	17,26 $\pm$ 2,75

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significantes em comparação ao controle negativo e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (H_2O_2).

Para os grupos de tratamento com o peptídeo $A\beta_{(1-42)}$, foi observado que o $A\beta_{(1-42)}$ (controle positivo) induziu cerca de 21,8% de morte celular por apoptose, enquanto que os compostos híbridos TA8Amino e TAHB3 associados ao peptídeo $A\beta_{(1-42)}$ levaram a uma redução da morte por apoptose de 5,10 e 4,85% respectivamente, assim como o composto donepezila também promoveu uma redução de 6,90% de morte por apoptose quando comparados ao controle positivo ($A\beta_{(1-42)}$). Apenas o composto Tacrina não foi capaz de reduzir os níveis de morte por apoptose nessas condições de tratamento. Os demais tratamentos com os compostos inibidores da AChE testados isoladamente não demonstraram aumento significativo na indução de morte por apoptose (**Figura 26, Tabela 13**). Não foram observadas alterações significativas quanto à indução de células necróticas (**Tabela 13**).

Figura 26: Porcentagem de células apoptóticas (células positivas para anexina V) após ensaio de neuroproteção frente ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo Aβ₍₁₋₄₂₎ (25μM); os resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle negativo e ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (Aβ₍₁₋₄₂₎). Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. DMSO 0,1% (controle negativo); AR 10 μM (controle positivo); composto TA8Amino (0,014 μM); TAHB3 (0,71 μM); donepezila (0,0057 μM); tacrina (0,23 μM).

Tabela 13: Porcentagem de células apoptóticas e necróticas observado após o ensaio de neuroproteção frente ao dano neurotóxico induzido pelo peptídeo Aβ₍₁₋₄₂₎ (25μM) analisados por citometria de fluxo utilizando o reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*) quantificando as celular positivas para anexina V e 7-AAD. Análise estatística *One-Way Anova* com pós teste *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão.

Morte celular (± Desvio Padrão)		
Grupos de Tratamentos	Células Apoptóticas (%) Anexina V positivas	Células Necróticas (%) 7-AAD positivas
DMSO	10,1 ± 0,85	10,83 ± 2,75
Aβ (25μM)	21,8 ± 2,55***	13,06 ± 3,00
TA8Amino	12,5 ± 0,00###	14,16 ± 6,09
TA8Amino + Aβ	16,7 ± 1,13**	10,33 ± 2,70
TAHB3	12,9 ± 2,26###	11,00 ± 3,25
TAHB3 + Aβ	16,95 ± 1,06**	12,5 ± 3,32
Donepezila	13 ± 1,13###	9,96 ± 2,30
Donepezila + Aβ	14,9 ± 0,28**	9,7 ± 2,54
Tacrina	11,7 ± 0,28###	8,76 ± 1,50
Tacrina + Aβ	19,95 ± 1,06***	11,73 ± 1,86

** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significantes em comparação ao controle negativo e ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (Aβ₍₁₋₄₂₎).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os inibidores da colinesterase aumentam a transmissão colinérgica diretamente inibindo a enzima AChE, que hidrolisa a acetilcolina (Anand; Singh, 2013). Além disso, especificamente, a AChE é um componente importante das placas A β . Em particular, a AChE liga-se ao peptídeo A β , promovendo assim a formação de fibrilas A β e a ocorrência de neurotoxicidade. Ainda, o aumento da expressão da AChE no cérebro de camundongos transgênicos que apresentam neurodegeneração acelera a formação de placas A β (Xiang et al., 2014). Nesse contexto, supõe-se que os inibidores específicos de AChE possam impedir a agregação adicional de fibrilas A β . De fato, a pesquisa com drogas sintéticas inibidoras da AChE tendem a avançar em direção a inibidores que sejam capazes de reduzir a deposição de amiloide (Zimmermann, 2013).

Os compostos híbridos de tacrina e donepezila (TA8Amino e TABH3) sintetizados por Chierrito e colaboradores (2017), com base na estrutura tridimensional da enzima AChE são potentes moduladores alostéricos da AChE. Esses são capazes de atingir funções colinérgicas e não-colinérgicas, fixando uma conformação específica da AChE, confirmada por estudos de ressonância magnética nuclear e modelagem molecular. No presente trabalho, primeiramente foi realizado um ensaio de viabilidade celular para avaliação da indução de citotoxicidade e hepatotoxicidade para diferentes concentrações dos compostos híbridos, não sendo observados efeitos na maior parte dos tratamentos realizados. Apenas uma pequena sensibilização das células HepG2 foi observada para a maior concentração testada do composto TABH3 (2,84 μ M) no tempo de 24 horas, sendo essa concentração 4 vezes maior que a de IC₅₀ de inibição da AChE deste composto (0,71 μ M). Deste modo, os compostos híbridos mostraram-se promissores, uma vez que não foram capazes de induzir alterações na viabilidade das células analisadas nas concentrações próximas ao IC₅₀ de inibição da AChE. Assim, tais compostos apresentam uma maior vantagem quando comparados aos fármacos atualmente em uso na clínica, uma vez que vários inibidores de colinesterase aprovados para a terapia da DA demonstraram benefícios relativamente modestos e múltiplos efeitos colaterais para os pacientes (Zhang et al., 2014).

O caminho mais intensamente estudado atualmente para obtenção de novos compostos com atividades de neuroproteção na DA se relaciona com o desenvolvimento

neuronal, particularmente neuritogênese e migração neuronal, além da plasticidade sináptica em espinhas dendríticas em neurônios maduros (Gordon-Weeks, 2016). A capacidade limitada de regeneração de neurônios é um grande desafio na prevenção e tratamento da DA e de outros distúrbios neurodegenerativos. A neuritogênese é um processo de diferenciação neuronal, a qual ocorre como neuritos nascentes de uma célula pós-mitótica. Caracteriza-se pela elongação das extensões celulares, chamadas de neuritos, que em seguida diferenciam-se em axônios ou em um complexo arbóreo dendrítico (Crepaldi et al., 2013). Embora o fator de crescimento de neurotrofina endógena (NGF) exerça efeito de promoção de neuritogênese e tenha sido proposto para o tratamento da DA, a sua aplicação foi prejudicada pela dificuldade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), como também por múltiplos efeitos colaterais, como distúrbio cognitivo, dor neuropática e inflamação exacerbada (Liu et al., 2018), o que torna necessária a busca por novos compostos terapêuticos que possam atuar na promoção de neurogênese e neuritogênese como novos mecanismos de neuroproteção.

Sabe-se que a enzima AChE não atua apenas na transmissão sináptica como também pode exercer efeitos morfológicos não-clássicos no desenvolvimento de neurônios, como a estimulação do crescimento de neuritos. Um aumento significativo do crescimento neurítico em comparação aos controles foi observado para os neurônios que super-expressam a AChE. Há muitos exemplos documentados em que o crescimento de neuritos é precedido ou associado à expressão da colinesterase, ocorrendo muito antes do início da neurotransmissão colinérgica (Sperling et al., 2012). Entretanto, de forma contrária aos dados da literatura, em nossos experimentos, os compostos testados inibidores da AChE foram capazes de induzir neurodiferenciação e crescimento de neuritos nas células SH-SY5Y tornando-as morfológicamente mais semelhantes aos neurônios primários, principalmente nos tratamentos com a TA8Amino, sendo este composto capaz de induzir 55% de células neurodiferenciadas, como também TAHB3 (43%) em relação ao controle com DMSO (0,1%), em que foi possível observar as extensões neuríticas em neurônios maduros estendendo seus neuritos e estabelecendo sinapses após 8 dias de neurodiferenciação. Tal processo é vital para a rede neuronal e pode contribuir amplamente na regeneração neuronal, uma vez que anomalias na neuritogênese constitui uma marca das enfermidades neurodegenerativas (Crepaldi et al., 2013).

Neurônios maduros derivados do tratamento com SH-SY5Y com AR por 7 a 10 dias expressam marcadores catecolaminérgicos/neuronais adultos, como tirosina hidroxilase (TH), enolase-2 e a β -III tubulina, permitindo a utilização deste modelo para estudos moleculares sobre terapia de substituição celular, diferenciação neuronal, modelagem de doenças e triagem de drogas (Kunzler et al., 2017). Os compostos híbridos testados levaram ao aumento da expressão da proteína β -III-Tubulina de aproximadamente 75% para o composto TA8Amino e 47% para o TAHB3, enquanto que donepezila e tacrina, fármacos já utilizados no tratamento de pacientes com DA, não demonstraram capacidade de induzir neurodiferenciação. Provavelmente, os compostos testados podem ter induzido a diferenciação neuronal por vias secundárias e não propriamente pela inibição da AChE, atuando de forma diferente ao do indutor de neurogênese e neuritogênese AR (Sperling et al., 2012). Entretanto, quanto à cinética de ciclo celular após 8 dias de neurodiferenciação, nenhum dos compostos avaliados, inclusive o AR, foi capaz de gerar alterações na progressão do ciclo celular. Da mesma forma, não alteraram a capacidade de proliferação celular ao longo dos 8 dias de neurodiferenciação, enquanto que o AR promoveu uma taxa de proliferação celular mais lenta, apesar de não alterar a cinética do ciclo celular,. Bell e colaboradores (2013) observaram que o tratamento com AR inibe a proliferação de células, sendo observada uma redução na taxa de proliferação em $\sim 75\%$. Desse modo, esses dados demonstram que os compostos híbridos TA8Amino e TAHB3 não atuam pelos mesmos mecanismos de inibição da proliferação celular de AR para promover a neuritogênese e neurogênese nestas células.

A indução de neurodiferenciação pelo AR ocorre a partir da geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, sendo esse um passo essencial (KUNZLER et al., 2017). O AR é o principal metabólito ativo do retinol, da família retinóide de compostos relacionados (que inclui a vitamina A) e pode influenciar o estado oxidante da célula devido às propriedades intrínsecas redox-ativas. Classicamente, os efeitos do AR são mediados pelos receptores do RAR e RXR. Vários estudos relatam ações secundárias por retinóides, e alguns deles dependem da produção de espécies reativas e modificações redox (Kunzler et al., 2017). Além disso, há evidências de que os efeitos pró-oxidantes do AR são um passo limitante e esses efeitos são necessários para a diferenciação de células SH-SY5Y ao mesmo tempo em que reduz a oxidação de NADH mitocondrial (KUNZLER et al., 2017). Relativo a

esse contexto, foram realizados ensaios para avaliar os parâmetros mitocondriais na linhagem SH-SY5Y após 8 dias de neurodiferenciação com os compostos testados. Os dados obtidos demonstraram que o híbrido sintético TA8Amino foi capaz de induzir a produção de ROS intracelular (48,27%) e mitocondrial (67,60%), entretanto, o AR induziu apenas a produção de ROS intracelular (62,74%) e diminuiu a produção de ROS mitocondrial (56,44%). Esse efeito do AR foi estudado por Silvis e colaboradores (2016) utilizando a mesma sonda de marcação do radical superóxido mitocondrial, *MitoSox*, sendo observado que a oxidação de *MitoSOX* aumentou na presença do tratamento com AR por 48 horas nas células SK-N-SH. No entanto, a oxidação de *MitoSOX* diminuiu a partir de 72h, no mesmo período em que ocorreu um aumento significativo na atividade de SOD. A MnSOD é uma enzima antioxidante responsável por converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é facilmente transportado ao meio intracelular. Deste modo, a quantificação da expressão proteica de SOD1 (CuZnSOD) indicou um aumento significativo na expressão dessa proteína nos tratamentos com AR (~38%) e compostos híbridos, TA8amino (~78%) e TAHB3 (~74%). Provavelmente, a diminuição observada na produção de ROS mitocondrial após 8 dias de neurodiferenciação em nossos experimentos poderia se relacionar com o aumento na indução de SOD1 levando a uma conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio como mecanismo de defesa antioxidante nessas células.

As moléculas híbridas TA8amino e TAHB3 não promoveram alterações no potencial de membrana mitocondrial e massa mitocondrial sob as condições de tratamento empregadas no presente estudo, sendo que apenas o AR foi capaz de diminuir o potencial de membrana mitocondrial (60,21%) e causar um aumento significativo na massa mitocondrial (150,43%) após os 8 dias de neurodiferenciação. Esses dados demonstram que o composto TA8Amino não ocasionou danos por disfunção mitocondrial nas células neurodiferenciadas, sendo capaz de induzir neurodiferenciação sem alterar a capacidade de proliferação nessas células, diferentemente do AR. Gurunathan e Kim (2018) verificaram que células tratadas com AR (1 μ M) por 24 horas apresentaram uma perda significativa de potencial de membrana mitocondrial em células-tronco de teratocarcinoma (F9), devido à capacidade de AR em promover a permeabilização da membrana mitocondrial para prótons. Além disso, Mu e colaboradores (2018) observaram por microscopia eletrônicas de varredura que o

tratamento com AR (1 μ M) triplicou o número de mitocôndrias nas células diferenciadas por 7 dias, confirmando os resultados obtidos no presente projeto.

Ativada por vários fatores de crescimento, a cascata de sinalização PI3K / AKT é uma via de sobrevivência celular importante, que também pode regular o processo de diferenciação de várias células. A superexpressão de PI3K constitutivamente ativa induz o crescimento de neuritos e a expressão de marcadores neuronais (Qiao et al., 2012). Sabe-se que o AR promove a fosforilação da Akt por meio de mecanismos independentes de transcrição (García-Escudero et al., 2013). Como a ativação de Akt é independente dos mecanismos de transcrição e RAR α é o principal mediador de efeitos ATRA independentes de transcrição, Garcia-Escudero e colaboradores (2013) avaliaram a possível associação entre RAR α e Akt levando à formação do complexo Akt-RAR; esses autores demonstram que o AR promove a ativação de PI3k-Akt via mecanismos independentes de transcrição e mediados pela interação RAR α -Akt.

A partir da ativação de RAR e ERK 1/2, o AR induz a síntese de COX-2 e prostaglandina E2 em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano levando à neurodiferenciação dessas células (Cheng et al., 2013). Por conseguinte, Qião e colaboradores (2012) observaram que o inibidor de PI3K, LY294002, bloqueia o crescimento de neuritos induzidos por RA e a expressão de marcadores neuronais, sugerindo que a ativação da sinalização PI3K está envolvida na regulação da diferenciação neuronal. Neste contexto, no presente trabalho foram analisadas a expressão proteica de PTEN_(Ser380/Thr382/383) (inativo), Akt_(Ser473) (ativa) e COX2 após os 8 dias de diferenciação neuronal induzida pelos AChEI. Os resultados indicaram que os compostos híbridos, TA8amino e TAHB3, foram capazes de induzir um aumento significativo na expressão de PTEN_(Ser380/Thr382/383) e de Akt_(Ser473). Além disso, AR e os compostos híbridos TA8Amino e TAHB3 foram capazes de induzir um aumento significativo na expressão proteica de COX2. Esses dados demonstram que os compostos testados poderiam atuar ao nível da via de sinalização PI3K/AKT/COX2, de tal forma a promover a diferenciação neuronal e crescimento de neuritos nas células SH-SY5Y.

A questão mais relevante relativa à plasticidade neuronal provavelmente permanece a ser respondida; esta se refere ao papel dos novos neurônios na atividade funcional do cérebro maduro e se estes exibem relevância clínica (Baptista; Andrade, 2018). No entanto,

as diferenças na extensão da neuroproteção, neurogênese e/ou no mecanismo envolvido podem ser importantes no sucesso terapêutico. Até o presente, poucos ensaios clínicos comparativos foram realizados com os diferentes AChEIs atualmente utilizados na prática clínica para o tratamento da DA, sendo que os resultados desses estudos ainda permanecem inconclusivos (Kivipelto et al., 2018).

Na DA, a formação dos oligômeros do peptídeo amiloide é uma das principais causas de neurotoxicidade e morte neuronal por apoptose. A agregação extracelular dos peptídeos A β é observada na região hipocampal dos pacientes com DA, sendo os principais A $\beta_{(1-40)}$ ou A $\beta_{(1-42)}$; além de outro fragmento de peptídeo A $\beta_{(25-35)}$ que também é um peptídeo tóxico biologicamente ativo. Atualmente, estudos têm abordado principalmente novos fármacos multi-alvos que demonstrem o conjunto de atividades, tais como a inibição da AChE, ação anti-amiloidogênica e neuroprotetora, entre outras, com o intuito de impedir a formação e toxicidade do peptídeo A β , conferindo desta forma uma proteção aos neurônios (Shanmuganathan et al., 2018).

Com o objetivo de avaliar a capacidade neuroprotetora dos novos compostos híbridos, foram realizados no presente trabalho ensaios de neuroproteção na linhagem SH-SY5Y, sob condições de exposição ao estresse oxidativo e ao dano neurotóxico, utilizando H₂O₂ e o peptídeo A $\beta_{(1-42)}$, respectivamente. Os resultados mostraram que os compostos híbridos inibidores da AChE TA8amino e TAHB3 foram capazes de proteger as células neuronais SH-SY5Y apenas contra o dano neurotóxico induzido pelo peptídeo A $\beta_{(1-42)}$, sendo capazes de levar a uma proteção de 91,93% para TA8Amino e 54,68% para TAHB3, conforme demonstrado nos ensaios de neuroproteção. Além disso, os compostos TA8Amino e TAHB3 levaram a uma redução significativa de morte por apoptose de 5,10 e 4,85% respectivamente, nas células tratadas com o peptídeo A $\beta_{(1-42)}$, enquanto que os fármacos donepezila e tacrina não foram capazes de proteger as células tratadas. Estes dados demonstram o potencial destes compostos no sentido de atuar duplamente na inibição da enzima AChE, bem como na proteção das células neuronais frente aos danos ocasionados pelo peptídeo A β , principal indutor de danos em pacientes com a DA.

Valencia e colaboradores (2018) relataram as atividades neurogênica e neuroprotetora de novos compostos híbridos de donepezila-flavonoides com IC₅₀ de inibição da AChE

próximos ao do fármaco donepezila, demonstrando que esses compostos protegem a linhagem celular neuronal cSH-SY5Y contra o estresse oxidativo mitocondrial induzido por rotenona (30 μM) e oligomicina A (10 μM), promovendo também a maturação das células-tronco neurais de camundongos C57BL em um fenótipo neuronal, o que poderia contribuir para a reparação dos tecidos neuronais.

Por outro lado, Dias Viegas e colaboradores (2018) utilizaram uma outra abordagem de hibridação molecular baseada na combinação, em uma única molécula, da subunidade farmacofórica N-benzil-piperidina de donepezila e avaliada para atividades multi-alvos relacionadas à DA, tais como atividade anti-inflamatória concomitante *in vitro* e *in vivo*, avaliada contra a neuroinflamação induzida pelo oligômero $\text{A}\beta_{(1-42)}$. Entretanto, o IC_{50} de inibição da AChE dos compostos de melhor atividade foram 25,4 e 8,65 μM , sendo esses valores extremamente altos quando comparados ao obtido para a donepezila (IC_{50} 0,0057 μM).

Os dados do presente trabalho demonstraram que para os compostos híbridos, a combinação das principais características estruturais dos fármacos donepezila e tacrina resultaram em melhoria das propriedades farmacodinâmicas, entre outras atividades biológicas, tornando tais moléculas híbridas promissoras e de grande potencial, comparado aos fármacos já utilizados, os quais inibem apenas um dos sítios da AChE e não apresentam atividade neuroprotetora ou de indução de neurodiferenciação.

Uma vez que a neurogênese e a sobrevivência celular dos neurônios são processos que necessitam uma melhor compreensão associada ao desenvolvimento de potenciais fármacos direcionados ao tratamento de doenças neurodegenerativas, há expectativa de que os resultados deste estudo possam fornecer informações relevantes para caracterizar as atividades biológicas dos compostos híbridos testados. Contudo, deve ser considerada a continuidade da pesquisa para melhor caracterizar as atividades biológicas dos novos compostos híbridos, bem como para explorar aspectos importantes sobre os mecanismos moleculares de ação dos mesmos quando combinados a agentes causadores de estresse neurotóxico, visando compreender os mecanismos de neuroproteção e neurogênese.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- Os compostos híbridos inibidores da AChE não apresentaram atividade citotóxica e hepatotóxica em todas as concentrações testadas e nos diferentes tempos avaliados nas linhagens SH-SY5Y e HepG2, respectivamente, exceto para o composto híbrido TAHB3, o qual foi hepatotóxico apenas na maior concentração (2,84 μ M) testada e no tempo de 24 horas, sendo este equivalente a uma redução de 16,4% da viabilidade celular na linhagem HepG2.
- Ambos os compostos híbridos TA8Amino e TAHB3 foram capazes de induzir diferenciação neuronal e neuritogênese em cerca de 55,0% e 43,0%, respectivamente, sendo observada a formação de pontos de redes de interconexões entre neurônios maduros, principalmente no grupo tratado com a TA8Amino, sendo tais características condizentes com a diferenciação em neurônios.
- A confirmação da indução de neurodiferenciação realizada pela quantificação da expressão proteica do marcador β -III-Tubulina demonstrou que apenas o composto TA8Amino induziu um aumento de aproximadamente 75% na expressão de β -III-Tubulina, comprovando assim a formação de neurônios maduros.
- Nenhum dos tratamentos realizados causou alterações significativas na distribuição das células nas fases do ciclo celular e apenas o AR induziu uma parada no número de duplicações celulares no ensaio de proliferação celular, condizente com a diferenciação neuronal.
- O híbrido sintético TA8Amino foi capaz de aumentar a produção de ROS intracelular (48,27%) e mitocondrial (67,60%), induzindo um quadro de estresse

oxidativo na neurodiferenciação. Entretanto, ambas as moléculas híbridas TA8amino e TAHB3 não promoveram alterações no potencial de membrana mitocondrial e massa mitocondrial. Esses dados demonstram que o estresse oxidativo induzido por TA8Amino não gerou danos por disfunção mitocondrial nas células diferenciadas.

- Na avaliação de alterações na expressão proteica de PTEN_(Ser380/Thr382/383), AKT_(Ser473) e COX2 ambos os compostos híbridos promoveram a indução de PTEN e AKT. TA8Amino e TAHB3 induziram um aumento significativo de COX2, demonstrando uma possível atuação na via de sinalização PI3K/AKT/COX2, o que é compatível com a diferenciação neuronal. Além disso, foi observado um aumento significativo na expressão de SOD1.
- Os compostos híbridos inibidores da AChE, TA8amino e TAHB3, não protegeram as células tratadas contra os danos por estresse oxidativo avaliados por viabilidade celular. Entretanto, apresentaram efeito neuroprotetor em face aos danos neurotóxicos induzidos pelo peptídeo A β ₍₁₋₄₂₎, promovendo uma proteção de 91,93% para TA8Amino e 54,68% para TAHB3.
- As moléculas híbridas TA8Amino e TAHB3 foram capazes de promover uma redução de morte celular por apoptose, 5,10 e 4,85%, respectivamente, nas células tratadas com o peptídeo A β ₍₁₋₄₂₎.
- Em geral, os resultados do presente trabalho demonstram que os compostos híbridos donepezila-tacrina (TA8amino e TAHB3), inibidores da AChE, apresentam vantagens como potenciais fármacos, visto não serem citotóxicos nas concentrações de inibição da enzima AChE, além de serem capazes de induzir diferenciação neuronal, neuritogênese e neuroproteção, diferentemente dos fármacos donepezila e tacrina, testados isoladamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramov, A. Y.; Berezhnov, A. V.; Fedotova, E. I.; et al. Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders. **Biochemical Society transactions**, v. 45, n. 4, p. 1025–1033, 2017.
- Alonso, D.; Dorronsoro, I.; Rubio, L.; et al. Donepezil–tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 6588–6597, 2005.
- AMES, B. N. Delaying the Mitochondrial Decay of Aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, n. 1, p. 406–411, 2004.
- Amor, S.; Peferoen, L. A. N.; Vogel, D. Y. S.; et al. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151–166, 2014.
- Anand, P.; Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer’s disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p. 375–399, 2013.
- Arias, E.; Gallego-Sandín, S.; Villarroja, M.; et al. Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 315, n. 3, p. 1346–53, 2005.
- Avramopoulos, D. Genetics of Alzheimer’s disease: recent advances. **Genome Medicine**, v. 1, n. 3, p. 34, 2009.
- Baptista, P.; Andrade, J. P. Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation and Possible Functional and Clinical Correlates. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 12, p. 44, 2018.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- Bell, N.; Hann, V.; Redfern, C. P. F.; et al. Store-operated Ca(2+) entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1833, n. 3, p. 643–51, 2013.
- Bhat, R.; Crowe, E. P.; Bitto, A.; et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer’s disease. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45069, 2012.
- Cadonic, C.; Sabbir, M. G.; Albeni, B. C. Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer’s Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 9, p. 6078–6090, 2016.
- Caspersen, C.; Wang, N.; Yao, J.; et al. Mitochondrial A β : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer’s disease. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 14, p. 2040–2041, 2005.
- Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease. **Redox biology**, v. 14, p. 450–464, 2018.

Chen, X.-P.; Lei, F.-Y.; Qin, Y.-H.; et al. The role of retinoic acid receptors in the signal pathway of all-trans retinoic acid-induced differentiation in adriamycin-induced podocyte injury. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 34, n. 6, p. 484–492, 2014.

Cheng, B.; Martinez, A. A.; Morado, J.; et al. Retinoic acid protects against proteasome inhibition associated cell death in SH-SY5Y cells via the AKT pathway. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 1, p. 31–42, 2013.

Chierrito, T. P. C. Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer. 2016.

Chierrito, T. P. C.; Pedersoli-Mantoani, S.; Roca, C.; et al. From dual binding site acetylcholinesterase inhibitors to allosteric modulators: A new avenue for disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 139, p. 773–791, 2017.

Crepaldi, C. R.; Merighe, G. K. F.; Laure, H. J.; et al. Isolamento e cultivo de neurônios e neuroesferas de córtex cerebral aviar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. suppl 1, p. 45–50, 2013.

Cui, H.; Kong, Y.; Zhang, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

De La Monte, S. M.; Wands, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **Journal of diabetes science and technology**, v. 2, n. 6, p. 1101–13, 2008.

Dias Viegas, F. P.; De Freitas Silva, M.; Divino da Rocha, M.; et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of N -benzyl-piperidinyl-aryl-acylhydrazones derivatives as donepezil hybrids: Discovery of novel multi-target anti-alzheimer prototype drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 48–65, 2018.

Douchamps, V.; Mathis, C. A second wind for the cholinergic system in Alzheimer's therapy. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 2 and 3-Spec Issue, p. 112–123, 2017.

Estrada Valencia, M.; Herrera-Arozamena, C.; De Andrés, L.; et al. Neurogenic and neuroprotective donepezil-flavonoid hybrids with sigma-1 affinity and inhibition of key enzymes in Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 534–553, 2018.

Feng, C.; Luo, T.; Zhang, S.; et al. Lycopene protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against hydrogen peroxide-induced death via inhibition of oxidative stress and mitochondria-associated apoptotic pathways. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 5, p. 4205–14, 2016.

Frota Junior, M. L. C. DA; Pires, A. S.; Zeidán-Chuliá, F.; et al. In vitro optimization of retinoic acid-induced neuritogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1–2, p. 325–334, 2011.

- Gao, C.; Ding, Y.; Zhong, L.; et al. Tacrine induces apoptosis through lysosome- and mitochondria-dependent pathway in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 4, p. 667–674, 2014.
- García-Escudero, V.; Martín-Maestro, P.; Perry, G.; et al. Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, p. 162152, 2013.
- Gordon-Weeks, P. R. The role of the drebrin/EB3/Cdk5 pathway in dendritic spine plasticity, implications for Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 126, p. 293–299, 2016.
- Görlach, A.; Dimova, E. Y.; Petry, A.; et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? **Redox Biology**, v. 6, p. 372–385, 2015.
- Gorlovoy, P.; Larionov, S.; Pham, T. T. H.; et al. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 8, p. 2502–2513, 2009.
- Gurunathan, S.; Kim, J.-H. Biocompatible Gold Nanoparticles Ameliorate Retinoic Acid-Induced Cell Death and Induce Differentiation in F9 Teratocarcinoma Stem Cells. **Nanomaterials**, v. 8, n. 6, p. 396, 2018.
- Hao, C.; Wang, W.; Wang, S.; et al. An Overview of the Protective Effects of Chitosan and Acetylated Chitosan Oligosaccharides against Neuronal Disorders. **Marine drugs**, v. 15, n. 4, 2017.
- Hirai, K.; Aliev, G.; Nunomura, A.; et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 3017–23, 2001.
- Hou, P.-S.; Huang, W.-C.; Chiang, W.; et al. Impaired neural differentiation potency by retinoic acid receptor- α pathway defect in induced pluripotent stem cells. **Cellular reprogramming**, v. 16, n. 6, p. 467–76, 2014.
- Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X.; et al. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 118, n. 1, p. 53–69, 2009.
- Isaacs, A. M.; Senn, D. B.; Yuan, M.; et al. Acceleration of Amyloid β -Peptide Aggregation by Physiological Concentrations of Calcium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 38, p. 27916–27923, 2006.
- Jiang, T.; Sun, Q.; Chen, S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 147, p. 1–19, 2016.
- Kimura, M.; Akasofu, S.; Ogura, H.; et al. Protective effect of donepezil against A β (1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. **Brain Research**, v. 1047, n. 1, p. 72–84, 2005.
- Kivipelto, M.; Mangialasche, F.; Ngandu, T. Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 11, p.

653–666, 2018.

Kong, Y.; Trabucco, S. E.; Zhang, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and the Mitochondria Theory of Aging. In: **Interdisciplinary topics in gerontology**. [s.l: s.n.]. v. 39p. 86–107.

Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1078, p. 9–21, 2013.

Kunzler, A.; Zeidán-Chuliá, F.; Gasparotto, J.; et al. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 9, p. 6903–6916, 2017a.

Kunzler, A.; Zeidán-Chuliá, F.; Gasparotto, J.; et al. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 9, p. 6903–6916, 2017b.

Larosa, V.; Remacle, C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, p. BSR20171492, 2018.

Leuner, K.; Schütt, T.; Kurz, C.; et al. Mitochondrion-Derived Reactive Oxygen Species Lead to Enhanced Amyloid Beta Formation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 12, p. 1421–1433, 2012.

Liu, J.; Yang, B.; Ke, J.; et al. Antibody-Based Drugs and Approaches Against Amyloid- β Species for Alzheimer's Disease Immunotherapy. **Drugs & Aging**, v. 33, n. 10, p. 685–697, 2016.

Liu, Q.; Fang, J.; Wang, P.; et al. Characterization of a pectin from *Lonicera japonica* Thunb. and its inhibition effect on A β 42 aggregation and promotion of neuritogenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 112–120, 2018.

Liu, R.; Barkhordarian, H.; Emadi, S.; et al. Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. **Neurobiology of Disease**, v. 20, n. 1, p. 74–81, 2005.

Liu, Z.; Zhou, T.; Ziegler, A. C.; et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–11, 2017.

Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

Luchtman, D. W.; Meng, Q.; Song, C. Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 226, n. 2, p. 386–396, 2012.

Luo, X.-T.; Wang, C.-M.; Liu, Y.; et al. New multifunctional melatonin-derived benzylpyridinium bromides with potent cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 302–311, 2015.

Maden, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 755–765, 2007.

Mandelkow, E.-M.; Stamer, K.; Vogel, R.; et al. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 8, p. 1079–85, 2003.

Mendiola-Precoma, J.; Berumen, L. C.; Padilla, K.; et al. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–17, 2016.

Miller, D. M.; Buettner, G. R.; Aust, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 95–108, 1990.

Mu, X.; Wen, J.; Chen, Q.; et al. Retinoic acid-induced CYP51 nuclear translocation promotes meiosis prophase I process and is correlated to the expression of REC8 and STAG3 in mice. **Biology open**, v. 7, n. 11, 2018.

Oka, S.; Leon, J.; Sakumi, K.; et al. Human mitochondrial transcriptional factor A breaks the mitochondria-mediated vicious cycle in Alzheimer's disease. **Scientific reports**, v. 6, p. 37889, 2016.

Ortuño-Sahagún, D.; Pallàs, M.; Rojas-Mayorquín, A. E. Oxidative stress in aging: advances in proteomic approaches. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 573208, 2014.

Picone, P.; Nuzzo, D.; Caruana, L.; et al. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 780179, 2014.

Poljsak, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2011, p. 194586, 2011.

Qiao, J.; Paul, P.; Lee, S.; et al. PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 424, n. 3, p. 421–6, 2012.

Roy Choudhury, S.; Karmakar, S.; Banik, N. L.; et al. Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma. **Journal of oncology**, v. 2012, p. 782020, 2012.

Saha, A.; Adak, S.; Chowdhury, S.; et al. Enhanced oxygen releasing capacity and oxidative stress in diabetes mellitus and diabetes mellitus-associated cardiovascular disease: a comparative study. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 361, n. 1–2, p. 141–9, 2005.

Sailor, K. A.; Schinder, A. F.; Lledo, P.-M. Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 42, p. 111–117, 2017.

Shanmuganathan, B.; Suryanarayanan, V.; Sathya, S.; et al. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic effect of α -bisabolol against A β induced neurotoxicity in PC12 cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1196–1207, 2018.

Silvis, A. M.; McCormick, M. L.; Spitz, D. R.; et al. Redox balance influences differentiation status of neuroblastoma in the presence of all-trans retinoic acid. **Redox Biology**, v. 7, p. 88–96, 2016.

Sperling, L. E.; Klaczinski, J.; Schütz, C.; et al. Mouse acetylcholinesterase enhances neurite outgrowth of rat R28 cells through interaction with laminin-1. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36683, 2012.

Sultana, R.; Mecocci, P.; Mangialasche, F.; et al. Increased Protein and Lipid Oxidative Damage in Mitochondria Isolated from Lymphocytes from Patients with Alzheimer's Disease: Insights into the Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease and Initial Investigations into a Potential Biomarker for this Dementing Disorder. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 24, n. 1, p. 77–84, 2011.

Teppola, H.; Sarkanen, J.-R.; Jalonen, T. O.; et al. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. **Neurochemical research**, v. 41, n. 4, p. 731–47, 2016.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

Villemagne, V. L.; Fodero-Tavoletti, M. T.; Masters, C. L.; et al. Tau imaging: early progress and future directions. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 1, p. 114–124, 2015.

Wen, M. M.; El-Salamouni, N. S.; El-Refaie, W. M.; et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. **Journal of Controlled Release**, v. 245, p. 95–107, 2017.

Wojsiat, J.; Zoltowska, K. M.; Laskowska-Kaszub, K.; et al. Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 6435861, 2018.

Wyss-Coray, T.; Mucke, L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. **Neuron**, v. 35, n. 3, p. 419–32, 2002.

Xiang, Y.-Y.; Dong, H.; Yang, B. B.; et al. Interaction of acetylcholinesterase with neurexin-1 β regulates glutamatergic synaptic stability in hippocampal neurons. **Molecular brain**, v. 7, p. 15, 2014.

Xun, Z.; Lee, D.-Y.; Lim, J.; et al. Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. **Mechanisms of ageing and development**, v. 133, n. 4, p. 176–85, 2012.

Yu, T.-S.; Kim, A.; Kernie, S. G. Donepezil rescues spatial learning and memory deficits

following traumatic brain injury independent of its effects on neurogenesis. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0118793, 2015.

Zhang, J.-X.; Wang, R.; Xi, J.; et al. Morroniside protects SK-N-SH human neuroblastoma cells against H₂O₂-induced damage. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 3, p. 603–612, 2017.

Zhang, R.; Zhang, J.; Fang, L.; et al. Neuroprotective effects of sulforaphane on cholinergic neurons in mice with Alzheimer's disease-like lesions. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 8, p. 14396–410, 2014.

Zhang, Z.; Chen, R.; An, W.; et al. A novel acetylcholinesterase inhibitor and calcium channel blocker SCR-1693 improves A β 25–35-impaired mouse cognitive function. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 4, p. 599–613, 2016.

Zimmermann, M. Neuronal AChE splice variants and their non-hydrolytic functions: redefining a target of AChE inhibitors? **British journal of pharmacology**, v. 170, n. 5, p. 953–67, 2013.