UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos
celulares de doenças neurodegenerativas**

Danilo Avelar Sampaio Ferreira

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos
celulares de doenças neurodegenerativas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em **Toxicologia**, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Orientado: Danilo Avelar Sampaio Ferreira

Ribeirão Preto

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Ferreira, Danilo Avelar Sampaio

Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de
doenças neurodegenerativas

57 p.: il ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Toxicologia.

Orientador: Santos, Antonio Cardozo dos.

1. beta-cariofileno; 2. Doenças neurodegenerativas; 3. Doença de Parkinson; 4. Doença de Huntington; 5. Doença de Alzheimer; 6. neuritogênese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Danilo Avelar Sampaio Ferreira

Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em **Toxicologia**, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

FERREIRA, D. A. S. **Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas** 2014. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

As doenças neurodegenerativas (DN) estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade nos países ocidentais. Não há ainda um tratamento definitivo para estas neuropatias, mas estudos têm indicado mecanismos comuns de toxicidade que incluem disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, apoptose e neuroinflamação. Adicionalmente, o efeito benéfico da neuroplasticidade induzida por fatores neurotróficos no retardamento ou inibição do processo neurodegenerativo também tem sido sugerido por muitos estudos. O beta-cariofileno é um sesquiterpeno bi-cíclico encontrado no óleo essencial de algumas plantas, e que possui efeito anti-inflamatório e antioxidante. Assim, este composto possui características e é capaz de induzir efeitos que o tornam um potencial candidato ao tratamento/prevenção dos processos envolvidos na neurodegeneração. Apesar disso, pouco se sabe sobre os efeitos e os mecanismos de ação do beta-cariofileno no processo de degeneração neuronal. Então, neste estudo, avaliou-se o efeito do beta-cariofileno em modelos celulares (PC 12) de neurotoxicidade que mimetizam *in vitro* os mecanismos moleculares envolvidos nas doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer, os quais, para efeitos práticos, denominaremos de “modelos celulares de Parkinson, Huntington e Alzheimer”. Estes modelos são induzidos experimentalmente pela neurotoxina dopaminérgica iodeto de 1-metil 4-fenil piridina (MPP⁺), pela neurotoxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3NP) e pelo peptídeo neurotóxico B-amiloide (AB42), respectivamente. O beta-cariofileno apresentou efeitos benéficos nestes três modelos de neurotoxicidade, e adicionalmente induziu neuritogênese e a expressão de proteínas neurotípicas no modelo neuronal. Este é o primeiro estudo a demonstrar tais efeitos do beta-cariofileno.

Palavras-chave: beta-cariofileno; Doenças neurodegenerativas; Doença de Parkinson; Doença de Huntington; Doença de Alzheimer; neuritogênese.

ABSTRACT

FERREIRA, D. A. S. **Evaluation of the protective effect of beta-caryophyllene on cellular models of neurodegeneration.** 2014. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Neurodegenerative diseases (ND) are among the leading causes of mortality and morbidity in Western countries. There is not a definitive treatment for these neuropathies, but studies have indicated common mechanisms of toxicity that include mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis. Additionally, the beneficial effect of the neuroplasticity induced by neurotrophic factors on the retardation or inhibition of neurodegeneration has also been suggested by several studies. Beta-caryophyllene is a bicyclic sesquiterpene found in essential oils of some plants, and possesses anti-inflammatory and antioxidant effects. Thus, this compound has characteristics and is capable of inducing effects that make it a potential candidate for treatment / prevention of the processes involved in neurodegeneration. Despite this, little is known about the effects and mechanisms of action of beta-caryophyllene in the neuronal degeneration process. Then, this study evaluated the effect of beta-caryophyllene in cellular models of neurotoxicity (PC 12) that mimic *in vitro* the molecular mechanisms involved in Parkinson's, Huntington's and Alzheimer's diseases, which, for practical purposes, we will denominate "Cellular models of Parkinson's, Huntington's and Alzheimer's diseases." These models are experimentally induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl iodide, 4-phenyl pyridine (MPP⁺), by the mitochondrial neurotoxin 3-nitropropionic acid (3NP) and the neurotoxic peptide B-amyloid (AB42), respectively. Beta-caryophyllene showed beneficial effects on these three models of neurotoxicity, and additionally induced neuritogenesis and the expression of neurotypic proteins in the neuronal model. This is the first study to demonstrate such effects of beta-caryophyllene.

Keywords: beta-caryophyllene; Neurodegenerative diseases; Parkinson's disease; Huntington's disease; Alzheimer's disease; neuritogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Populações Neurais acometidas nas doenças neurodegenerativas.....	3
Figura 2 Diferentes fatores associados ao desenvolvimento das doenças neurodegenerativas.....	4
Figura 3. Padronização do modelo celular de Parkinson. Efeito de diferentes concentrações de MPP ⁺ na viabilidade das células PC12 após 24 horas de incubação.....	20
Figura 4- Efeito do beta-cariofileno na viabilidade celular no Modelo Celular de Parkinson.. ..	21
Figura 5- Efeito do beta-cariofileno na atividade da caspase 3 no Modelo Celular de Parkinson.. ..	22
Figura 6 - Efeito do beta-cariofileno na viabilidade celular no Modelo Celular de Alzheimer.	23
Figura 7- Padronização do modelo celular de Huntington. Efeito de diferentes concentrações de 3-NP na viabilidade das células PC12 após 24 horas de incubação.....	24
Figura 8 - Efeito do beta-cariofileno (B-car) na viabilidade celular no Modelo Celular de Huntington.....	25
Figura 9 - Efeito intrínseco do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-144h).....	26
Figura 10 – Efeito do beta-cariofileno no alongamento dos neuritos do Modelo Neuronal.....	27
Figura 11 - Efeito do MPP ⁺ na diferenciação celular no Modelo Celular de Parkinson.	28
Figura 12 - Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-144h) no Modelo Celular de Parkinson.....	29
Figura 13 - Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-72h) no modelo de Huntington.....	30
Figura 14 - Efeito do fragmento AB42 na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-72h).....	31
Figura 15 - Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-72h) no modelo de Alzheimer.	32
Figura 16 - Expressão da sinaptofisina I no processo de diferenciação celular induzida pelo beta-cariofileno após 72h de incubação.....	33

Figura 17 - Expressão da sinapsina I no processo de diferenciação celular induzida pelo beta-cariofileno após 72h de incubação.....	34
Figura 18 - Expressão do GAP-43 no processo de diferenciação celular induzida pelo beta-cariofileno após 72h de incubação.	35
Figura 19 - Espectroscopia de ESR com o radical livre estável DPPH.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - difosfato de adenosina

Akt – proteína quinase B (ou PKB)

ANT - translocase de nucleótidos de adenina

Apaf-1 - fator ativador de protease apoptótica-1

ApoE ε4 – apolipoproteína E tipo 4

APP - precursor da proteína B-amilóide

ATCC - American Type Culture Collection

ATP - trifosfato de adenosina

AVC - acidente vascular cerebral

Bad – promotor de morte, associado à Bcl-2

Bak – proteína “matadora” (killer) homóloga antagonista da Bcl-2

Bax – proteína 4, do tipo Bcl-2

B-car (ou b-car) - beta-cariofileno

Bcl-2 - célula-B de linfoma 2

Bcl-w - proteína 2, do tipo Bcl-2

Bcl-X_L - célula-B de linfoma extra grande (*extra large*)

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

Bid - agonista de domínio de morte que interage com o BH3

Bim - mediador de morte celular que interagindo com Bcl-2

CAG – ciosina-adenina-guanina

Casp-3 – caspase 3

cypD - ciclofilina D

DA - dopamina

DA – doença de Alzheimer

DCF - 2,7'-diclorofluoresceína

DCF-DA - 2,7'-diclorofluoresceína-diacetato

DH - Doença de Huntington

DISC - complexo de sinalização induzido por morte

DJ-1 (gene) - gene causal para a DP familiar (park7) e também um oncogene; envolvido na regulação da transcrição, na reação antioxidante ao estresse oxidativo, e na regulação mitocondrial e de chaperonas e proteases

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - dimetil-sulfóxido

DN - doenças neurodegenerativas

DNA – ácido desoxirribonucleico

DOPAC - ácido 3,4-diidroxifenilacético

DP - doença de Parkinson

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DR3, DR4, DR5 e DR6 – receptores de morte (*death receptors*) celular 3, 4, 5 e 6, respectivamente

ECA - enzima de conversão da angiotensina

ELA - esclerose lateral amiotrófica

ELISA - ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas

ERK – quinase extracelular regulada por sinal

ERO - espécies reativas de oxigênio

ESR - espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, ou espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (*electron paramagnetic resonance*)

FADD – Faz associado a um domínio de morte

Fas – proteína da membrana celular, pertencente à família dos fatores de necrose tumorais (TNF)

FasL – Faz ligante

FCN - fator de crescimento de neuritos

Fe – ferro

FIA - fator indutor de apoptose

FTD - demência fronto-temporal

GABA - ácido γ -aminobutírico

GSH - glutatona reduzida

HAS - hipertensão arterial sistêmica

HTT - gene da huntingtina

htt - proteína huntingtina

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

H₃PO₄ – ácido fosfórico

IAP - proteínas inibidoras de apoptose

ICC - insuficiência cardíaca congestiva

IL-1 β – interleucina 1 β

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

IT15 - gene que codifica a proteína huntingtina (htt)

LDH - lactato-desidrogenase

L-DOPA - L-3,4-dihidroxifenilalanina

LRRK2 – quinase (cinase) 2 rica em repetições de leucina

MAO - monoamino-oxidase

MAOA - monoamino-oxidase A

MAOB - monoamino-oxidase B

MMP-3 – metaloproteinase da matriz mitocondrial 3

MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridina

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MTT - (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo)

NF-κB - fator nuclear-kappa-B

NGF – fator de crescimento de neuritos (*nerve growth factor*)

NK (células) - células *natural killers*

NM - neuromelanina

NMDA - N-metil-D-aspartato

NO - óxido nítrico

OH[·] - radical hidroxil

O₂^{·-} - ânion superóxido

Parkin – proteína codificada no gene PARK2 e pertencente ao complexo ubiquitina ligase E3

PARP – poli (ADP-ribose) polimerase

PBS - solução salina tamponada (*phosphate buffered saline*)

PC 12 – célula de feocromocitoma de ratos

PINK1 – quinase (cinase) 1 pontual induzida por PTEN, ou uma proteína quinase (cinase) mitocondrial serina/treonina codificada pelo gene PINK1

PPAR-γ - receptor proliferador de peroxissoma gama

PS1 – presenilina 1

PS2 – presenilina 2

PTP - poros de transição de permeabilidade

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD – superóxido dismutase

t-bth - terc-butil-hidroperóxido

TAR - região responsiva íransatuante

TDP-43 - proteína TAR de ligação DNA 43

TNF – fator de necrose tumoral

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TNFR1 ou TNFR1 – receptor I do fator de necrose tumoral

TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

TRAIL-R1 - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) receptor 1
(também chamado DR4)

TRAIL-R2 - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) receptor 2
(também chamado DR5)

TrkA - receptor neurotrófico tirosina-quinase do tipo 1 (ou do tipo A)

UCH-L1 - ubiquitina C-terminal de L1 hidrolase

VDAC - canal aniônico dependente de voltagem

VMAT - transportadores vesiculares monoamina

3-NP – ácido 3-nitropropiónico

4p63 - braço curto do cromossomo 4

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Doenças Neurodegenerativas (DN)	2
1.2 Estresse Oxidativo e Neurodegeneração	7
1.3 Apoptose e Neurodegeneração.....	7
1.4 Importância da neuritogênese na prevenção e/ou tratamento das DN	8
1.5 beta-cariofileno (b-car)	9
2 OBJETIVOS.....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Reagentes.....	13
3.2 Cultura celular	13
3.3 Modelo Celular de Parkinson	13
3.4 Atividade da Caspase 3 (executora)	14
3.5 Modelo Celular de Alzheimer	14
3.6 Modelo Celular de Huntington	14
3.7 Ensaio de viabilidade celular (MTT)	15
3.8 Avaliação da indução do crescimento de neuritos - Neuritogênese	15
3.9 Expressão de proteínas neurotípicas– Western Blot.....	16
3.10 Determinação da atividade antioxidante por Ressonância do Spin Eletrônico (ESR)	17
3.11 Análise estatística	18
4.1 Padronização do modelo celular de Parkinson	20
4.2 Efeito do beta-cariofileno na morte celular induzida pelo MPP ⁺ no Modelo Celular de Parkinson	21
4.3 Efeito do beta-cariofileno na atividade da caspase-3 induzida pelo MPP ⁺ no Modelo Celular de Parkinson	22

4.4 Efeito do beta-cariofileno na morte celular induzida pelo peptídeo AB42 no Modelo Celular de Alzheimer	23
4.5 Padronização do modelo celular de Huntington	24
4.6 Efeito do beta-cariofileno na morte celular induzida pelo 3-NP no Modelo Celular de Huntington.....	25
4.7 Efeito intrínseco do beta-cariofileno na diferenciação celular (Modelo Neuronal).....	26
4.8 Efeito do beta-cariofileno no alongamento dos neuritos.....	27
4.9 Efeito do MPP ⁺ na diferenciação celular (Modelo de Parkinson)	28
4.10 Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular no Modelo de Parkinson.....	29
4.11 Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular no Modelo de Huntington ...	30
4.12 Efeito do fragmento AB42 na diferenciação celular (Modelo de Alzheimer).....	31
4.13 Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular no Modelo de Alzheimer.....	32
4.14 Efeito do beta-cariofileno na expressão da sinaptofisina I no Modelo Neuronal.....	33
4.15 Efeito do beta-cariofileno na expressão da sinapsina I no Modelo Neuronal	34
4.16 Efeito do beta-cariofileno na expressão do GAP-43 no Modelo Neuronal	35
4.17 Avaliação da ação antioxidante do beta-cariofileno por espectroscopia de ESR.....	36
 5 DISCUSSÃO	38
 6 CONCLUSÕES	45
 REFERÊNCIAS.....	47

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Neurodegenerativas (DN)

Com o prolongamento da expectativa média de vida e o avanço da tecnologia médica, a incidência das DN tem aumentado. Estima-se que atualmente cerca de 1 bilhão de indivíduos em todo o mundo sejam portadores de DN (1)

O aumento da população de idosos está resultando em um aumento da incidência de comprometimento cognitivo leve, que é caracterizado por um nível menos grave (mas anormal) do comprometimento cognitivo e um alto risco de desenvolver demência (2, 3)

A incidência e a prevalência de comprometimento cognitivo grave também é crescente. A doença de Alzheimer (DA) afeta aproximadamente 4,5 milhões de norte-americanos e deverá aumentar para valores entre 11 e 16 milhões em 2050. A Doença de Parkinson (DP), por sua vez, acomete aproximadamente um milhão de pessoas nos Estados Unidos, sendo que 60 mil novos casos são diagnosticados a cada ano, e sua incidência é projetada para quadruplicar até 2040 (2-5).

As DN se caracterizam por uma diminuição no número de células de populações específicas de neurônios (**Figura 1**). Essas doenças podem causar perda de funções cognitivas e físicas, sendo causadas, na maioria das vezes, por mecanismos como o estresse oxidativo, apoptose neuronal e respostas inflamatórias (**Figura 2**) (2, 6, 7).

Figura 1 - Populações Neurais acometidas nas doenças neurodegenerativas. a) diferentes doenças neurodegenerativas, tais como a esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Parkinson (DP), doença de Huntington (DH) e doença de Alzheimer (DA), afetam diferentes áreas do cérebro adulto. Cada uma começa em regiões específicas e, posteriormente, afeta outras regiões. Mesmo dentro destas regiões precocemente afetadas, danos neuronais seletivos das subclasses de neurônios podem ser observados; por exemplo, os neurônios dopaminérgicos na DP, os neurônios motores em ALS, ou os neurônios colinérgicos e glutamatérgicos no AD. b) Idade de início das doenças neurodegenerativas herdadas (de início precoce) e esporádicas (de início tardio) (2).

Figura 2 Diferentes fatores associados ao desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (7).

1.1.1 Doença de Parkinson (DP)

Na doença de Parkinson (DP) a perda se dá principalmente nos neurônios dopaminérgicos da substância negra e gânglios basais, o que se reflete clinicamente por dificuldades na coordenação dos movimentos (8). A DP está associada com uma perda seletiva dos neurônios na região do mesencéfalo conhecida como *pars compacta* da *substantia nigra*. Estes neurônios contêm o neurotransmissor dopamina e as fibras nervosas que o transportam, que residem no corpo estriado. A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum e sua prevalência aumenta com a idade, afetando 1% das pessoas com mais de 60 anos de idade, 3,4% das pessoas acima de 70 anos, e 4% das pessoas acima de 80 anos (9, 10). Os principais sintomas da DP incluem tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural, e, quando a doença progride, outros sintomas, como depressão, demência, alterações do sono e insuficiência autonômica, também podem se tornar evidentes (11).

Como os sintomas primários de DP estão relacionadas com a deficiência no neurotransmissor dopamina, o tratamento atual da DP envolve a administração de medicamentos que facilitem a neurotransmissão dopaminérgica. Isto inclui um precursor da dopamina, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), inibidores da monoamina oxidase e agonistas do receptor de dopamina. A estimulação cerebral profunda após a manipulação cirúrgica também está sendo utilizado em pacientes com graves problemas motores. Nenhuma das terapias atualmente disponíveis, no entanto, interfere na degeneração em si, e o tratamento crônico com L-DOPA, acarreta efeitos secundários (adversos) motores e psiquiátricos. Apesar da maioria dos casos de DP serem esporádicos (idiopáticos) (90-95%), formas familiares (genéticas) raras, envolvendo mutações em vários genes, já foram descritas (12).

A maioria dos casos de DP são esporádicos, sendo que os fatores ambientais desempenham um papel crucial na etiologia da DP. A exposição ocupacional aos herbicidas ou praguicidas está associada ao surgimento da DP. O praguicida rotenona e o herbicida de amplo espectro paraquat reproduziram o fenótipo da DP em modelos animais (8, 12).

1.1.2 Doença de Huntington (DH)

A doença de Huntington (DH) é conhecida como doença neurodegenerativa poliglutamínica, por apresentar como principal fator etiológico uma mutação genética, decorrente de uma expansão instável de repetições CAG (citosina-adenina-guanina) na região codificante do gene da huntingtina (HTT), que está localizado no braço curto do cromossomo 4 (4p63) e codifica a proteína huntingtina (htt) (13-15).

Caracteriza-se clinicamente pelo comprometimento cognitivo progressivo, por distúrbios no movimento e por sintomas neuropsiquiátricos. O início da doença geralmente ocorre durante a quarta e a quinta década de vida, e os sinais e sintomas progridem com o envelhecimento (com uma média de sobrevida de 15-20 anos) (14, 16)

A perda neuronal seletiva, predominantemente no estriado, ou em outras estruturas dos gânglios basais, é a responsável pela maior parte das características clínicas. Assim, a principal característica patológica da DH é a atrofia progressiva do estriado (núcleo caudado e putâmen) (13, 15). Na DH, a neurodegeneração seletiva dos neurônios pré-sinápticos, liberadores de ácido γ -aminobutírico (GABA), do estriado é predominante, embora a perda de neurônios em muitas outras regiões do

cérebro também tenha sido relatada. Apresenta prevalência de 5-10 casos por 100.000 em todo o mundo, o que a torna a doença neurodegenerativa hereditária mais comum (15, 16).

A maioria das características clínicas da doença de Huntington pode ser atribuída à degeneração do Sistema Nervoso Central (SNC), mas alguns aspectos da doença podem ser mediados à parte do SNC (17), incluindo perda de peso e perda de massa muscular, disfunção metabólica e distúrbios do sistema endócrino. Dentro do cérebro, observa-se intensa morte de células neuronais no estriado (18), com a perda de até 95% dos neurônios pré-sinápticos GABAérgicos, que se conectam à medula espinhal, projetam-se para o globo pálido e para a substância negra, ao passo que interneurônios grandes são poupados seletivamente. Além disso, há atrofia do córtex cerebral, da substância branca subcortical, do tálamo, dos núcleos hipotalâmicos específicos e de outras regiões do cérebro, embora menos graves do que no corpo estriado. Em casos avançados, especialmente com início juvenil, há atrofia cerebral generalizada (15)

1.1.3 Doença de Alzheimer (DA)

A DA é a causa mais comum de demência em idosos. Mais de 100 mutações altamente raras têm sido descritas em três genes (APP, PSEN1, PSEN2) no caso da DA familiar de início precoce. Na forma de início tardio mais comum, um polimorfismo no gene da apolipoproteína E tem sido associado com o aumento da susceptibilidade à doença. No entanto, estudos recentes sugerem que estes quatro genes são responsáveis por menos de 30% da variância genética para AD e que outros fatores genéticos ainda não identificados estariam envolvidos (19). A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e insidiosa do sistema nervoso central, caracterizada por déficits globais na cognição que vão desde a perda de memória ao comprometimento da capacidade de julgamento e raciocínio (20). Existem duas lesões patológicas características: os emaranhados neurofibrilares intracelulares (ENF) e os depósitos amilóides extracelulares nas placas senis (PS). Os ENF são agregados de microtúbulos de proteína Tau hiperfosforilada. Os depósitos amilóides nas placas senis são formados por peptídeos beta-amilóide (Abeta): Abeta40 (AB40) e Abeta42 (AB42). Estes peptídeos são derivados da proteína precursora amilóide Abeta, que é considerada um fator muito importante para a patogênese da DA, tanto familiar quanto esporádica (21).

1.2 Estresse Oxidativo e Neurodegeneração

O dano oxidativo é particularmente nocivo ao cérebro, devido às suas peculiaridades: é formado por ácidos graxos insaturados, consome altas taxas de oxigênio e não dispõe de elevados níveis de enzimas antioxidantes (22, 23). As doenças degenerativas estão associadas à mecanismos comuns de toxicidade, tais como: a ocorrência do estresse oxidativo associado à disfunção mitocondrial e morte celular por apoptose (23-27).

O metabolismo energético fosforilativo desempenha um papel importante na indução da morte celular presente nas desordens neurodegenerativas e a proteção da função mitocondrial tem sido proposta como potencial estratégia terapêutica por vários autores (28-30).

Radicais livres, comumente gerados na respiração mitocondrial, causam dano oxidativo a ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e proteínas (31). O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) na célula, formadas permanentemente durante a redução do oxigênio molecular à água, resulta do desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes celulares, sendo designado estresse oxidativo (32). O estresse oxidativo promove a degeneração celular em consequência dos efeitos citotóxicos de ERO, tais como radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (32-34). Devido aos seus efeitos potencialmente lesivos, e, sendo os neurônios susceptíveis ao ataque por espécies radicalares, as ERO e os processos oxidativos em que essas estão envolvidas, têm sido associados a várias lesões neuronais, observadas, por exemplo, na isquemia cerebral, na esclerose lateral amiotrófica e na doença de Parkinson (35-37).

1.3 Apoptose e Neurodegeneração

A apoptose desempenha importante papel na homeostase dos diferentes tecidos e o descontrole desse processo está associado a várias doenças, incluindo neoplasias, doenças auto-imunes e neurodegenerativas. O processo apoptótico pode ser disparado por uma variedade de estímulos que promovem a ativação de proteases, denominadas caspases. Em células de mamíferos, a apoptose ocorre preferencialmente por duas vias: extrínseca e intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte, tais como Fas, TNFRI, DR3, DR4, DR5 e DR6 (38, 39). A via intrínseca ou mitocondrial se inicia pela ação

de diferentes sinais de estresse intracelular (irradiações, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular), todos eles tendo a mitocôndria como ponto de convergência. A ativação da via mitocondrial promove a liberação de citocromo c para o citosol, resultando na ativação da cascata de caspases que conduzem a célula à apoptose (39).

Membros-chave da superfamília de proteínas Bcl-2, anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-X_L) e pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bim e Bid), atuam respectivamente, inibindo ou induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial externa e, consequentemente, a sinalização para a ocorrência da apoptose (40).

1.4 Importância da neuritogênese na prevenção e/ou tratamento das DN

Uma abordagem interessante como estratégia terapêutica nas doenças neurodegenerativas é regeneração de axônios. O crescimento de neuritos e a diferenciação neuronal desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso. Ocorrem em resposta à ação de proteínas sinápticas como, por exemplo, a sinaptofisina I que promove aumento no número e densidade das sinapses neurológicas (41).

O crescimento de processos axonais e dentríticos durante o desenvolvimento do cérebro é um determinante crítico para a conectividade neuronal e alterações deste processo podem levar a déficits cognitivos. Em decorrência disto, o crescimento de neurito é estudado extensivamente *in vitro* na avaliação do neurodesenvolvimento (42-44). Há vários modelos *in vitro* que são bem caracterizados e têm sido utilizados para determinar os efeitos dos compostos químicos no crescimento de neuritos (44, 45). As células PC12, por exemplo, quando estudadas na presença do fator de crescimento neuronal (FCN), se diferenciam, adquirindo distintos fenótipos para a produção de neurotransmissores, receptores, emitem projeções neuríticas e aumentam a excitabilidade (46).

Células neuronais são capazes de responder à informação molecular do meio extracelular que instruem o processo de maturação, induzindo a regeneração neurológica em situações patológicas, tais como trauma ou doenças neurodegenerativas. A presença de neuritos em células transplantadas ou endógenas é considerada como uma indicação do potencial neuroregenerativo (47, 48).

1.5 beta-cariofileno

Os sesquiterpenos são um grupo de metabólitos secundários presentes em uma grande variedade de famílias de plantas e que apresentam uma série de efeitos biológicos e farmacológicos (49). Muitos sesquiterpenos já foram identificados. Plantas marinhas e terrestres e alguns microrganismos são fonte de derivados oxidados ou modificados destes compostos (50). As lactonas sesquiterpênicas são descritas como compostos ativos de diversas plantas medicinais sendo responsáveis, possivelmente, pelos efeitos antimicrobiano, citotóxico, antitumoral, antiulcerativo e anti-inflamatório, bem como outros efeitos ainda não bem descritos no Sistema Nervoso Central (SNC) e no sistema cardiovascular (49, 50).

O beta-cariofileno é um sesquiterpeno bi-cíclico encontrado em óleos essenciais de várias plantas, como por exemplo, *Eugenia caryophyllata* (51), *Piper nigrum* (52), *Zingiber nimmonii* (53), e no óleo, ou bálsamo, de copaíba, *Copaifera reticulata* (54) muito utilizado na medicina popular nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e como uma das substâncias voláteis expelidas pelo milho, com o propósito de minimizar danos provocados por animais herbívoros ou por patógenos (55). Apresenta um odor “amadeirado” e picante característico, o que tem feito com que o beta-cariofileno seja utilizado em alguns alimentos e bebidas, para conferir sabor cítrico e também como aromatizante em detergentes, sabões, loções e cremes (56). Além disso, também está presente na lista dos “Aditivos Permitidos em produtos do tabaco” no Reino Unido (57).

Há relatos de atividade antiproliferativa em células de adenocarcinoma renal humano e melanoma amelanótico (58), além de atividades anestésica local (59), antibacteriana (60), antiviral (61), antifúngica (62), antinociceptiva (63), anti-artrítica (64) e, principalmente, anti-inflamatória de óleos ou óleo-resinas que contém o beta-cariofileno como seu principal componente (65). Estudos *in vitro* sugerem que o beta-cariofileno atua no receptor canabinóide do tipo 2 (CB2), promovendo inibição das vias pró-inflamatórias, incluindo CD14/TLR4/MD2, com consequente diminuição da expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Estudos *in vivo*, também comprovaram que a administração do β -cariofileno por via oral reduz a inflamação decorrente do dano excitotóxico do córtex motor, por mecanismo envolvendo redução da ativação da microglia (66).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares (PC 12) de neurotoxicidade que mimetizam *in vitro* os mecanismos moleculares das doenças de Parkinson, Huntington ou Alzheimer, bem como avaliar o possível efeito neurotrófico do beta-cariofileno em modelo neuronal.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Foram utilizados reagentes de elevado grau de pureza, sendo no mínimo grau analítico P.A. Para o preparo das soluções foi utilizada água do Tipo I (ultra-pura) obtida em sistema de purificação por osmose reversa (RIOS DI-3), seguido de purificação em sistema Milli-Q Gradiente (Millipore, Bedford, USA). As neurotoxinas (MPP⁺, 3-NP, AB42), beta-cariofileno, MTT, anticorpos primários produzidos em camundongos ou coelhos, anticorpo secundário (anti-IgG de camundongos ou coelhos conjugados com peroxidase, HRP), coquetel inibidor de proteases, coquetel inibidor de fosfatases e soro fetal bovino foram adquiridos da Sigma-Aldrich (MO, USA). O soro equino e a solução de antibióticos foram obtidos da GIBCO® (Life Technologies Corporation, USA). Os reagentes para Western Blot (tampões, membranas e géis para SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

3.2 Cultura celular

Foram utilizadas células de feocromocitoma de rato (PC 12), adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC) e mantidas em meio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) suplementado com 5% de soro bovino fetal, 10% de soro equino e 0,1% de uma mistura de antibióticos composta por 5mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10mg/mL de neomicina, em atmosfera umidificada composta de 95% de ar e 5% de CO₂, a 37%.

3.3 Modelo Celular de Parkinson

A neurodegeneração dopaminérgica foi induzida com MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinium-iodeto), como previamente descrito (67). Após 24 horas de incubação (densidade de 1×10^5 células/poço), as células foram adicionadas de diferentes concentrações da neurotoxina dopaminérgica MPP⁺ (500 μ M, 1mM, 5 mM e 10 mM) e novamente incubadas por 24h. De acordo com os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade foi definida a concentração da neurotoxina (MPP⁺10mM) a ser utilizada no Modelo Celular de Parkinson para os ensaios de neuroproteção. Para os ensaios relacionados à neuritogênese foi definida a concentração de 1mM de MPP⁺ (sub-letal).

3.4 Atividade da Caspase 3 (executora)

Foi utilizado kit colorimétrico (“Caspase 3 Assay Kit”, Sigma-Aldrich), seguindo-se as recomendações do fabricante, com algumas modificações. As células ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram incubadas por 24h para adesão e então tratadas com as neurotoxinas de cada modelo celular e o beta-cariofileno. A seguir foram tratadas com o Tampão de Lise (fornecido com o kit), mantidas no gelo por 10 min. e em seguida centrifugadas (16.000 g, 15 min., 4°C). O sobrenadante obtido foi adicionado da mistura de reação (fornecida com o kit) e incubado durante 12 horas a 37°C. Após este período, a absorbância do cromóforo PNA liberado com a clivagem do substrato foi determinada a 405 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®).

3.5 Modelo Celular de Alzheimer

A neurodegeneração foi induzida com o peptídeo neurotóxico AB42 com previamente descrito. Após 24 horas de incubação (densidade de 1×10^5 células/poço), as células foram adicionadas de diferentes concentrações de AB42 (0,5 μ M, 1,0 μ M e 2,2 μ M) e novamente incubadas por 24h. De acordo com os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade foi definida a concentração da neurotoxina (AB-42 2,2 μ M) a ser utilizada no Modelo Celular de Alzheimer para os ensaios de neuroproteção. Para os ensaios relacionados à neuritogênese foi definida a concentração de 1 μ M de AB42.

3.6 Modelo Celular de Huntington

A neurodegeneração foi induzida com o ácido 3-nitropropiónico (3-NP), como previamente descrito (67). Após 24 horas de incubação (densidade de 1×10^5 células/poço), as células foram adicionadas de diferentes concentrações da neurotoxina mitocondrial 3-NP (5 mM, 10 mM e 25 mM) e novamente incubadas por 24h. De acordo com os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade foi definida a concentração da neurotoxina (3-NP 10mM) a ser utilizada no Modelo Celular de Huntington para os ensaios de neuroproteção. Para os ensaios relacionados à neuritogênese, efeito que precede a morte celular, foi definida a concentração de 5mM de 3-NP.

3.7 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A solução de MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo)) 5mg/mL foi preparada em PBS e, em seguida, filtrada em membrana de 0,22µm. Esta solução foi armazenada em freezer e protegida da luz. As células ($2,0 \times 10^4$ células/poço) foram incubadas em placas de 96 poços por 24 h em DMEM suplementado e então tratadas com Triton X-100 0,2% (controle positivo); MPP⁺ 10mM; MPP⁺10mM e beta-cariofileno (10; 50, 100 e 150 µM). Também foi feito o controle negativo (não-tratado). Após incubação por 24h, o meio foi desprezado e 20 µL de MTT (5mg/mL) foram adicionados em cada poço (concentração final 0,5mg/mL). Em seguida a placa foi incubada por 3 horas a 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e para que ocorresse lise celular foram adicionados 200 µL de DMSO (dimetil-sulfóxido) em cada poço. A placa foi agitada (37°C, 5 min) e a absorbância da solução foi determinada a 570nm, usando-se uma leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®). O solvente de lise celular foi usado como branco de reagentes (68).

3.8 Avaliação da indução do crescimento de neuritos - Neuritogênese

As células PC-12 (2×10^5 células/poço) foram incubadas em placa de 24 poços por 24 horas para adesão e então tratadas com as neurotoxinas de cada modelo celular e beta-cariofileno. Após este período, o meio de cultivo (DMEM suplementado) foi substituído pelo meio de diferenciação F12 K Nutrient com L-glutamina, 1% de soro equino, 1% de mistura de antibióticos. Foi avaliado o efeito intrínseco do beta-cariofileno no modelo neuronal (células PC12 sem tratamento) e o efeito neuroprotetor nos modelos celulares de Parkinson, Huntington e Alzheimer. No controle positivo as células foram tratadas com NGF ("*Nerve Growth Factor from Vipera lebetina venom*", 100 ng/mL). As células foram então incubadas por 6 dias (144 h), sendo que a neuritogênese foi avaliada a cada 24h por microscopia óptica invertida com contraste de fase (aumento: 250x). Foram obtidas 10 fotomicrografias por poço a cada 24h de incubação. Para determinação da porcentagem de células com neuritos nas imagens digitalizadas foi empregado o software Image J open source (NIH, USA). Apenas aquelas células com pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior que o diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas (69).

3.9 Expressão de proteínas neurotípicas– Western Blot

Preparo do Lisado celular: Após incubação (72h, 37°C) com MPP+, beta-cariofileno, ou NGF, as células (2×10^5 células/poço) foram lavadas com PBS gelado e homogeneizadas com 200 µL de tampão de lise Tris-Triton (Tris 10mM, pH 7,4; NaCl 100mM, EDTA 1mM; EGTA 1mM; Triton x-100 1%; glicerol 10%; SDS 0,1%; deoxicolato 0,5%, coquetel inibidor de protease 1:200 e inibidor de fosfatase 1%). Todo o procedimento de lise celular foi realizado em banho de gelo para reduzir a atividade das proteases. As células foram então transferidas com auxílio de *scraper* para microtubos de centrífuga e agitadas em termomixer (300 rpm, 30 minutos, 4°C). Após centrifugação (12.000rpm, por 20 min a 4°C), os precipitados foram desprezados, e os lisados celulares (sobrenadantes) foram armazenados em freezer (-80°C) até a realização do ensaio. Uma alíquota de 10 µL de cada lisado celular foi separada para determinação da proteína pelo método de Bradford descrito a seguir.

Determinação de Proteína no lisado celular

Foi empregado o reativo de cor Protein Assay Dye reagent Concentrate (Bio-Rad) e foi seguido o protocolo sugerido pelo fabricante. Os lisados foram diluídos 5x com água e foi utilizada uma curva de calibração de BSA (40 – 400 µg/mL). O reagente de cor foi diluído 5x com água. A reação de cor foi feita em placas de 96 poços, adicionando-se 10µL da amostra diluída ou do padrão e 200 µL do reagente de cor diluído. Após agitação por 5 minutos as absorbâncias em 595 nm foram determinadas em leitora de microplacas. Devido à conhecida interferência dos componentes do tampão de lise na reação de Bradford, foram feitos brancos de reativos contendo 10µL de tampão de lise diluído (5x, como as amostras) e as absorbâncias dos brancos foram descontadas das absorbâncias das amostras. As concentrações das amostras foram calculadas com base na equação da reta da curva de calibração e multiplicadas pelo fator de diluição (x5).

Eletroforese em Gel: As amostras foram diluídas com tampão de lise de modo a obter-se 20µg de proteína/mL de solução e foram adicionadas de igual volume de tampão de Laemli (50 µL de cada), sendo então aquecidas por 10 minutos a 95°C. Alíquotas de 30µL foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (10 poços) e separadas por eletroforese (1h, 160V) em cuba eletroforética contendo 1L de tampão TRIS/Glicina (Bio-Rad).

Transferência: As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (1h:10min, 0,37A) em cuba eletroforética (Bio-Rad) contendo 1L de tampão TRIS/Glicina/SDS (Bio-Rad).

Reação imune: As membranas foram incubadas (30 min, T.A., 300 rpm) com tampão de bloqueio contendo BSA 5% em TBST (tampão TBS contendo Tween 20), incubadas (1 h, T.A.) com os anticorpo primários (anti-sinaptofisina anti-GAP-43 ou anti-sinapsina), lavadas com TTBS e incubadas (overnight, 4°C) com o anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (anti-mouse IgG-HRP) diluído (1:20.000) Após lavagem com TTBS e TBS, as membranas foram tratadas com 3mL de “ECL Western Blotting Detection Reagents” (1,5 mL de cada reativo) e foi realizada a digitalização das bandas em sistema de detecção de quimioluminescência (ChemiDoc Bio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA)). A quantificação das bandas foi feita por densitometria ótica (D.O.) usando-se o Image J open source software (NIH, USA). Posteriormente os procedimentos foram repetidos para quantificação da B-actina, proteína usada como controle de carregamento. Para tal, as membranas foram tratadas com tampão de *stripping* (2% de SDS, 62,5 mM de TRIS pH 6,8 e 100 mM de mercaptoetanol) e submetidas à imunorreação com anticorpo primário monoclonal anti-B-Actina diluído (1:3000) e com o mesmo anticorpo secundário (anti-mouse IgG-HRP, 1:20.000). Os demais procedimentos foram os mesmos usados na primeira etapa. Após quantificação das bandas de B-actina (Image J open source software, NIH,USA), os valores de D.O das proteínas em estudo foram divididos pelos valores de D.O. da B-actina para normalização dos resultados. (70). Todos os anticorpos usados foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) e as diluições utilizadas encontram-se dentro das faixas de diluição recomendadas pelo fabricante.

3.10 Determinação da atividade antioxidante por Ressonância do Spin Eletrônico (ESR)

(a) Radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

A atividade antioxidante do beta-cariofileno contra os radicais livres DPPH foi estudada utilizando várias concentrações de beta-cariofileno (0-10 mM) diluído em metanol. Alíquotas da solução de DPPH (200 µM, 40 µl) foram misturadas com as

soluções de beta-cariofileno (40 µL de cada concentração) e com metanol (40 µL de referência) e foram transferidas para tubos capilares, que foram selados e colocados dentro de um tubo de quartzo VHS padrão (diâmetro interno 3,00 milímetros). A ressonância eletromagnética foi determinada em espectrômetro X-band (Jeol JES-FA200) operando com um campo magnético central 345 mT, campo de digitalização de 8 mT, modulação de amplitude de 0,1 mT, modulação de frequência de 100 kHz e potência de microondas de 2mW (71).

(b) Spin trap DMPO

Para medir atividade antioxidante do beta-cariofileno contra o radical hidroxila (OH) foi utilizado o spin trap DMPO. A reação utilizada para gerar radicais livres foi a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$). O ensaio foi conduzido da seguinte forma: a) adição de 40µL de H_2O_2 100mM a 40µL de FeSO_4 10mM e 40µL de DMPO 10mM diluído em PBS (controle); b) adição de 40µL de H_2O_2 100mM a 40µL de FeSO_4 10mM e 40µL de DMPO 10mM diluído em PBS a 40µL de diferentes concentrações (0,3; 1, 5 e 10mM) de beta-cariofileno também diluído em PBS (teste). A solução final foi colocada em tubo capilar e após 3 minutos foi realizada a aquisição dos espectros de ressonância do spin eletrônico. Os parâmetros de aquisição dos espectros foram: Campo central 344 mT, potência 2mW, varredura 15mT, tempo de varredura 1minuto, amplitude de modulação 0.1mT, ganho 1000 (71).

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa “GraphPad Prism version 5.00 for Windows”, One Way Anova com análise pós-teste de Bonferroni (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Foi adotado $p < 0,05$ como nível de significância. Para validação dos modelos de doenças neurodegenerativas as toxinas MPP⁺, AB42 e 3-NP foram comparadas ao controle e para análise da neuroproteção, diferentes concentrações do beta-cariofileno foram comparadas aos grupos tratados com as neurotoxinas dos modelos celulares de Parkinson, Alzheimer e Huntington, respectivamente.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do modelo celular de Parkinson

Para a padronização do modelo celular de Parkinson, o efeito tóxico da neurotoxina dopaminérgica 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) foi avaliado sobre a viabilidade celular em 4 diferentes concentrações. Das quatro concentrações testadas (500 μ M, 1mM, 5mM e 10 mM) a neurotoxina MPP⁺ reduziu, significativamente, o número de células viáveis em relação ao controle ($90,60 \pm 2,82\%$) apenas na concentração de 10mM ($51,54 \pm 3,31\%$). Com base nestes resultados, os ensaios de neuroproteção no modelo Parkinson foram conduzidos com esta concentração de MPP⁺ (10 mM, concentração final no poço). Os dados são apresentados na **Figura 3**.

Figura 3. Padronização do modelo celular de Parkinson. Efeito de diferentes concentrações de MPP⁺ na viabilidade das células PC12 após 24 horas de incubação. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (n=9). *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). O maior valor de absorbância foi normalizado para 100% de células viáveis. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.2 Efeito do beta-cariofileno na morte celular induzida pelo MPP⁺ no Modelo Celular de Parkinson

Todas as concentrações de B-cariofileno (10; 50, 100 e 150 μ M) adicionadas ao Modelo Celular de Parkinson protegeram significativamente contra a morte celular induzida pelo MPP⁺ 10mM. Normalizando-se o maior valor de absorbância para 100%, tem-se que o MPP⁺ 10mM reduziu a viabilidade celular para $21,48 \pm 0,63\%$ e o beta-cariofileno aumentou a viabilidade celular para: $77,43 \pm 3,27\%$ (10 μ M); $89,09 \pm 6,41\%$ (50 μ M); $63,45 \pm 4,56\%$ (100 μ M) e $50,25 \pm 2,21\%$ (150 μ M). Curiosamente, o maior valor de viabilidade foi obtido com 50 μ M de beta-cariofileno e a partir desta concentração a proteção contra a morte celular foi menos eficaz (Figura 4).

Figura 4- Efeito do beta-cariofileno na viabilidade celular no Modelo Celular de Parkinson. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle), # Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao MPP⁺). O maior valor de absorbância foi normalizado para 100%. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.3 Efeito do beta-cariofileno na atividade da caspase-3 induzida pelo MPP⁺ no Modelo Celular de Parkinson

O beta-cariofileno (10 μ M), apresentou efeito protetor contra o aumento da atividade da caspase-3 induzida pelo MPP⁺. O maior valor de absorbância foi normalizado para 100% de atividade. O MPP⁺ induziu um aumento significativo na atividade da caspase-3 (99,74 $\pm$ 2,18 %) em relação ao controle (3,09 $\pm$ 1,04 %); enquanto o beta-cariofileno reduziu significativamente a atividade da caspase-3 induzida pelo MPP⁺ (76,98 $\pm$ 0,29 %). Os dados são apresentados na **Figura 5**.

Figura 5- Efeito do beta-cariofileno na atividade da caspase 3 no Modelo Celular de Parkinson. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. O maior valor de absorbância foi normalizado para 100%. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao MPP⁺). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.4 Efeito do beta-cariofileno na morte celular induzida pelo peptídeo AB42 no Modelo Celular de Alzheimer

O peptídeo AB42 reduziu significativamente a viabilidade celular ($12,53 \pm 0,98\%$) com relação ao controle ($111,3 \pm 2,35\%$). O beta-cariofileno reduziu significativamente a morte celular induzida pelo peptídeo AB42 quando adicionado nas concentrações de $10\mu\text{M}$ ($41,51 \pm 8,37\%$), $25\mu\text{M}$ ($35,67 \pm 9,46\%$) e $50\mu\text{M}$ ($23,74 \pm 13,74\%$). Os dados são apresentados na **Figura 6**.

Figura 6 - Efeito do beta-cariofileno na viabilidade celular no Modelo Celular de Alzheimer. B-car $10\mu\text{M}$ + A β_{42} $2,2\mu\text{M}$, B-car $25\mu\text{M}$ + A β_{42} $2,2\mu\text{M}$ e B-car $50\mu\text{M}$ + A β_{42} $2,2\mu\text{M}$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos realizados em sextuplicatas. Os dados expressos indicam a porcentagem de células viáveis, considerando o controle como cerca de 100% de células viáveis. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.5 Padronização do modelo celular de Huntington

Na padronização do modelo celular de Huntington, o efeito tóxico do ácido nitropropionico (3-NP) sobre a viabilidade celular foi avaliado em 3 diferentes concentrações. As três concentrações testadas (5mM, 10mM, 25mM) reduziram significativamente o número de células viáveis ($44,10 \pm 1,26\%$; $22,70 \pm 0,41\%$ e $16,20 \pm 0,30\%$, respectivamente) em relação ao controle ($93,67 \pm 1,99\%$). Baseando-se nestes resultados, os ensaios de viabilidade no modelo Huntington foram conduzidos com o 3-NP 5mM, concentração suficiente para induzir aproximadamente 50% da morte celular (**Figura 7**).

Figura 7- Padronização do modelo celular de Huntington. Efeito de diferentes concentrações de 3-NP na viabilidade das células PC12 após 24 horas de incubação. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. O maior valor de absorbância foi normalizado para 100%. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.6 Efeito do beta-cariofileno na morte celular induzida pelo 3-NP no Modelo Celular de Huntington

Todas as concentrações beta-cariofileno avaliadas (10, 25, 50, 100 e 150 μ M) reduziram significativamente ($54,20 \pm 1,07\%$; $67,68 \pm 1,81$; $86,91 \pm 10,03\%$; $66,88 \pm 5,76$ e $43,25 \pm 2,04$ respectivamente) a morte induzida pelo 3-NP ($40,17 \pm 1,69\%$). O grupo controle foi normalizado para 100% ($100,0 \pm 6,06\%$) (**Figura 8**).

Figura 8 - Efeito do beta-cariofileno (B-car) na viabilidade celular no Modelo Celular de Huntington. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao 3-NP). O maior valor de absorbância foi normalizado para 100%. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.7 Efeito intrínseco do beta-cariofileno na diferenciação celular (Modelo Neuronal)

O beta-cariofileno e o NGF (100 ng/mL, controle positivo) aumentaram significativamente o número de células diferenciadas com relação ao controle, em todos os períodos avaliados (24, 48, 72, 96, 120 e 144h), como demonstrado na **Figura 9**.

Figura 9 - Efeito intrínseco do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-144h). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.8 Efeito do beta-cariofileno no alongamento dos neuritos

Além de induzir a diferenciação celular, o beta-cariofileno (10 μ M) também induziu a formação de neuritos mais longos (Figura 10A e 10B). O comprimento dos neuritos observados no grupo tratado com beta-cariofileno foi significativamente maior (48,74 $\pm$ 0,65 μ m) do que o comprimento dos neuritos do grupo controle (22,53 $\pm$ 1,06 μ m) e até mesmo do grupo NGF (33,46 $\pm$ 0,66 μ m).

Figura 10 – Efeito do beta-cariofileno no alongamento dos neuritos do Modelo Neuronal. (A) Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 400x); (B) Representação gráfica do comprimento dos neuritos de cada grupo de tratamento (dados expressos como média $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao NGF). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.9 Efeito do MPP⁺ na diferenciação celular (Modelo de Parkinson)

A neurotoxina MPP⁺ inibiu significativamente o número de células com neuritos em relação ao controle ($99,99 \pm 3,70\%$), nas três concentrações testadas, reduzindo a porcentagem de células diferenciadas para $75,72 \pm 2,60\%$ (1mM); $28,84 \pm 2,62\%$ (5mM) e $2,00 \pm 1,12\%$ (10mM) (**Figura 11**).

Com base nestes resultados e nos resultados de citotoxicidade do MPP⁺, os ensaios de diferenciação celular no modelo Parkinson foram conduzidos com MPP⁺ 1mM, concentração sub-letal capaz de reduzir significativamente o número de células diferenciadas.

Figura 11 - Efeito do MPP⁺ na diferenciação celular no Modelo Celular de Parkinson. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. O maior valor de Absorbância foi normalizado para 100%. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.10 Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular no Modelo de Parkinson

A neurotoxina MPP⁺ reduziu significativamente a formação de neuritos nas células PC-12 nos períodos de 24, 48 e 72h de incubação ($4,12 \pm 0,28$; $4,12 \pm 0,18$ e $2,88 \pm 0,37\%$, respectivamente) quando comparado ao controle ($6,24 \pm 0,27$; $8,0 \pm 0,42$ e $10,14 \pm 0,53\%$). Após 96 e 144h de incubação o MPP⁺ impediu a diferenciação celular, que no controle continuou aumentando ($6,60 \pm 0,45$ e $9,77 \pm 0,32\%$, respectivamente). O beta-cariofileno ($10 \mu\text{M}$) reduziu significativamente o efeito inibitório do MPP⁺ durante todo o período de incubação (24h, $14,54 \pm 0,71$; 48h, $13,46 \pm 0,47$; 72h, $11,76 \pm 0,70$; 96h, $18,2 \pm 1,78$; 120h, $10,17 \pm 1,58$ e 144h, $9,71 \pm 2,32\%$). Na concentração maior, o beta-cariofileno ($50\mu\text{M}$) apresentou atividade protetora apenas até 96h de incubação (24h, $14,50 \pm 0,86$; 48h, $13,80 \pm 0,51$; 72h, $10,42 \pm 0,61$ e 96h, $2,62 \pm 1,57\%$). Comparado ao controle, o NGF induziu significativamente a diferenciação celular durante todo o período de incubação ($10,68 \pm 0,70$; $13,50 \pm 1,47$; $17,75 \pm 0,21$; $9,72 \pm 0,63$ e $22,20 \pm 0,97$, respectivamente). Os dados são apresentados na **Figura 12**.

Figura 12 - Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-144h) no Modelo Celular de Parkinson. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao MPP⁺).

4.11 Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular no Modelo de Huntington

Para validação do modelo foi feito um controle positivo com NGF que induziu significativamente a diferenciação celular (24h, $10,67 \pm 0,71$; 48h, $13,50 \pm 1,49$ e 72h, $17,75 \pm 0,21$) com relação ao controle (24h, $6,10 \pm 0,33$; 48h, $7,99 \pm 0,42$ e 72h, $10,14 \pm 0,53$). A neurotoxina 3-NP (5mM) reduziu significativamente o crescimento de neuritos nas células PC-12 nos períodos de incubação de 24h, 48h e 72h ($4,17 \pm 0,31$; $4,70 \pm 0,37$ e $2,37 \pm 0,36\%$, respectivamente) quando comparada ao controle 24h ($6,10 \pm 0,33$), 48h ($7,99 \pm 0,42$) e 72h ($10,14 \pm 0,53$) e impediu a diferenciação celular após 96h de incubação (dados não mostrados). O beta-cariofileno ($10 \mu\text{M}$) protegeu contra a inibição do crescimento de neuritos no modelo celular de Huntington durante todo o período de incubação (24h, $26,90 \pm 1,29$; 48h, $25,20 \pm 1,11$ e 72h, $10,25 \pm 0,27\%$) como apresentado na **Figura 13**. Após este período (96h), o beta-cariofileno não foi capaz de proteger contra a inibição completa da diferenciação celular induzida pelo 3-NP (dados não mostrados).

Figura 13 - Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-72h) no modelo de Huntington. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao 3-NP).

4.12 Efeito do fragmento AB42 na diferenciação celular (Modelo de Alzheimer)

Nas concentrações de 0,5 μM (24h $1,39 \pm 0,53$; 48h, $1,56 \pm 0,62$ e 72h, $1,01 \pm 0,38\%$), 1,0 μM (24h, $1,73 \pm 0,51$; 48h, $0,75 \pm 0,49$ e 72h, $1,03 \pm 0,50\%$) e 2,2 μM (24h, $1,03 \pm 0,52$; 48h, $0,73 \pm 0,36$ e 72h, $0,58 \pm 0,38\%$), o peptídeo neurotóxico AB42 inibiu significativamente a diferenciação celular quando comparado ao controle (24h, $2,59 \pm 0,1$; 48h, $3,43 \pm 0,20$ e 72h, $2,69 \pm 0,17\%$). O controle positivo (NGF) aumentou significativamente a diferenciação celular (24h, $4,41 \pm 0,36$; 48h, $4,81 \pm 0,34$ e 72h, $4,58 \pm 0,45\%$) quando comparado ao controle (24h, $2,59 \pm 0,1$; 48h, $3,43 \pm 0,20$ e 72h, $2,69 \pm 0,17\%$). Os dados foram apresentados na **Figura 14**.

Figura 14 - Efeito do fragmento AB42 na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-72h). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle).

4.13 Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular no Modelo de Alzheimer

O NGF induziu significativamente a diferenciação celular ($4,41 \pm 0,37$; $4,81 \pm 0,34$ e $4,58 \pm 0,45\%$) em relação ao controle ($2,59 \pm 0,10$; $3,43 \pm 0,20$ e $2,69 \pm 0,17$) após 24, 48 e 72h de incubação, respectivamente. A neurotoxina AB42 ($1\mu\text{M}$) reduziu significativamente a diferenciação celular no período avaliado (24, $0,95 \pm 0,46$; 48h, $1,04 \pm 0,53$ e 72 h, $0,92 \pm 0,45\%$). Apesar do intenso efeito do peptídeo AB42, o beta-cariofileno ($10\ \mu\text{M}$) foi capaz de proteger contra a inibição do crescimento de neuritos no modelo Alzheimer ($4,78 \pm 0,31$; $3,43 \pm 0,22$ e $5,43 \pm 0,61\%$), após 24, 48 e 72h d incubação. (**Figura 15**).

Figura 15 - Efeito do beta-cariofileno na diferenciação celular após diferentes períodos de incubação (24-72h) no modelo de Alzheimer. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). # Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao AB42).

4.14 Efeito do beta-cariofileno na expressão da sinaptofisina I no Modelo Neuronal

O beta-cariofileno ($1,25 \pm 0,10$) aumentou significativamente a expressão da sinaptofisina I em relação ao controle ($0,32 \pm 0,06$) após 72 horas de incubação (Figura 16).

Figura 16 - Expressão da sinaptofisina I no processo de diferenciação celular induzida pelo beta-cariofileno após 72h de incubação. (A) Representação gráfica da relação entre os valores de densidade ótica das bandas de sinaptofisina/B-actina. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). **(B)** Bandas das proteínas sinaptosina e B-actina reveladas por quimioluminescência. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.15 Efeito do beta-cariofileno na expressão da sinapsina I no Modelo Neuronal

O beta-cariofileno ($1,48 \pm 0,39$) aumentou significativamente a expressão da sinapsina I em relação ao controle ($0,35 \pm 0,08$) após 72 horas de incubação (**Figura 17**).

Figura 17 - Expressão da sinapsina I no processo de diferenciação celular induzida pelo beta-cariofileno após 72h de incubação. (A) Representação gráfica da relação entre os valores de densidade ótica das bandas de sinapsina/B-actina. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). (B) Bandas das proteínas sinapsina e B-actina reveladas por quimioluminescência. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.16 Efeito do beta-cariofileno na expressão do GAP-43 no Modelo Neuronal

O beta-cariofileno ($1,38 \pm 0,28$) aumentou significativamente a expressão da sinapsina I em relação ao controle ($0,60 \pm 0,03$) após 72 horas de incubação (**Figura 18**).

Figura 18 - Expressão do GAP-43 no processo de diferenciação celular induzida pelo beta-cariofileno após 72h de incubação. (A) Representação gráfica da relação entre os valores de densidade ótica das bandas de GAP-43/ β -actina. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle). **(B)** Bandas das proteínas GAP-43 e β -actina reveladas por quimioluminescência. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.17 Avaliação da ação antioxidante do beta-cariofileno por espectroscopia de ESR

A capacidade antioxidante do beta-cariofileno não pode ser observada por meio da espectroscopia de ESR com o radical livre estável DPPH (**Figura 19**) e com o spin trap DMPO (dados não mostrados), pois não houve redução da intensidade do sinal de ESR na presença de beta-cariofileno (0-10 mM), o que indica que os elétrons desemparelhados de DPPH não foram neutralizados (**Figura 19**), como também não foi observado o sequestro dos radicais ($\bullet$ OH), resultantes da reação de Fenton (dados não mostrados).

Figura 19 - Espectroscopia de ESR com o radical livre DPPH. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

As células PC-12, utilizadas neste estudo, são originalmente derivadas de um feocromocitoma de rato transplantável e são consideradas análogas de células precursoras dos neurônios simpáticos normais (72). São células pequenas (5-10 μ m), com quantidade limitada de citoplasma, e tem um tempo de duplicação longo (> 2 dias). Uma característica importante das células PC-12 é a sua capacidade de responder ao fator de crescimento neuronal (NGF), e, portanto, servir como um sistema modelo para células neuronais primárias. Quando tratadas com NGF, cessam a proliferação, formam longos neuritos e sofrem alterações associadas à diferenciação neuronal (73). No presente estudo foram usadas como Modelo Neuronal para a investigação da possível indução de neuritogênese pelo beta-cariofileno. Também foram empregadas nos Modelos de neurotoxicidade, neste caso tratadas com neurotoxinas específicas (MPP⁺, AB42 e 3-NP) que mimetizam *in vitro* os mecanismos moleculares possivelmente envolvidos nas doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington.

Um método bastante utilizado para avaliar a citotoxicidade após exposição a compostos tóxicos é o ensaio do MTT. Este ensaio avalia a atividade mitocondrial através da formação de um produto de cor violeta (a 570 nm) denominado formazam, que é formado pela redução do anel de tetrazolium do MTT. A redução ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase. Apenas mitocôndrias viáveis e funcionais reduzem o MTT a formazam. Através do ensaio de MTT é possível detectar morte neuronal por apoptose induzida por diferentes compostos tóxicos como também determinar o efeito protetor de compostos antiapoptóticos (Lobner 2000; Kim, Chung et al. 2003; Fotakis and Timbrell 2006). No presente estudo as neurotoxinas MPP⁺, AB42 e 3-NP induziram morte celular, detectada pela redução significativa do número de células viáveis nos modelos de Parkinson, Alzheimer e Huntington, respectivamente. Nossos resultados estão condizentes com a literatura, uma vez que a redução da viabilidade celular induzida por estas neurotoxinas é bastante citada (74-78). Assim, os modelos celulares empregados mostraram-se adequados para o estudo da neuroproteção.

O MPP⁺ é o metabólito tóxico do MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina), este último freqüentemente utilizado para produzir modelos *in vivo* de DP enquanto o primeiro, para explorar *in vitro* os mecanismos moleculares

possivelmente envolvidos na doença em humanos (Xu, Wei et al. 2007, Hajieva, Mocko et al. 2009). Alguns autores utilizaram o MPTP na concentração de 0,5 mM, com 72 horas de incubação e observaram morte de 50% das células PC-12 em relação ao controle. Com o seu metabólito MPP^+ , verificaram que o efeito tóxico foi 100 vezes mais evidente e atribuíram esta diferença ao fato de que as células PC-12 têm um maior número de sítios ligantes para MPP^+ do que para o seu precursor MPTP (79). Em outro estudo, foi demonstrado que na presença de MPP^+ (0,1 mM), os níveis de dopamina das células PC-12 são reduzidos em 4-7 dias, resultando em morte celular (80). Outros autores incubaram 1mM de MPP^+ com células PC-12 e observaram redução das células viáveis em cerca de 30%, em 4 dias (81). Em nossos ensaios, utilizamos uma concentração maior de MPP^+ (10 mM), a qual foi suficiente para induzir a morte de cerca de 50% das células PC-12 em 24 h. Porém, para analisar o efeito do beta-cariofileno contra a neurotoxina MPP^+ , no ensaio de diferenciação celular, a concentração de MPP^+ utilizada foi menor (1mM), pois observamos que nesta concentração ocorre uma redução do número de células contendo neuritos sem afetar a viabilidade celular no período de 24h. A redução do crescimento de neuritos parece ser um evento precoce no processo que conduz à morte neuronal (82).

Em relação ao modelo de Alzheimer, a neurodegeneração está associada ao efeito tóxico direto de fragmentos B-amilóides sobre os neurônios, sendo que o fragmento peptídico AB42 é o que está mais relacionado à formação de placas neuríticas (83, 84). Um estudo com células PC-12 relata 22,4% de diminuição da viabilidade celular após 24 h de incubação, quando este fragmento é utilizado na concentração de 1 μ M (85). Em nosso modelo de viabilidade celular utilizamos 2,2 μ M do peptídeo neurotóxico AB42, concentração que induziu morte de aproximadamente 50% das células PC-12 em 24 horas. Para o modelo de diferenciação celular utilizamos 1,0 μ M do fragmento AB42, que reduziu a diferenciação celular em 50%.

No modelo de Huntington foi usado o ácido 3-nitropropiónico, um inibidor irreversível da succinato desidrogenase, que acarreta depleção do ATP celular, causando degeneração seletiva, processo semelhante ao que ocorre na doença de Huntington (86). Um estudo utilizou 10mM de 3-NP em células PC-12 para investigar os efeitos neuroprotetores de diferentes agentes, em meios isentos de soro durante 6 horas (87). Neste estudo avaliamos as concentrações 5mM, 10mM e 25mM de 3-

NP, que induziram 49,9%, 70,97% e 77,97% de morte celular, respectivamente, após 24h de incubação. Assim, no Modelo celular de Huntington utilizamos 3-NP 5mM por induzir aproximadamente 50% de morte celular.

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, a capacidade do beta-cariofileno de reduzir significativamente a morte celular nestes 3 modelos de neurodegeneração. O beta-cariofileno é o principal componente do óleo-resina de copaíba, extraído do tronco de várias espécies de árvores do gênero *Copaífera* da família *Leguminosae*. As propriedades farmacológicas deste óleo incluem: ação diurética, laxante, antitetânica, antisséptica, cicatrizante, anti-inflamatória e antitumoral (66, 88, 89). O composto beta-cariofileno isolado tem sido associado à atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica (89).

O beta-cariofileno possui característica lipofílica, o que facilita a sua entrada nas células. Vários constituintes de óleos essenciais possuem diferentes atividades biológicas no SNC, o que indica que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (90). O beta-cariofileno é um fitocanabinóide, que atua seletivamente sobre o receptor canabinóide-2 (CB2), e seu efeito analgésico na dor neuropática foi demonstrado em camundongos (91).

Recentemente foram investigados os efeitos antiinflamatórios e neuroprotetores do óleo de copaíba na lesão aguda induzida por NMDA no córtex motor de ratos adultos. Os autores observaram que o tratamento com o óleo de copaíba reduziu o recrutamento dos neutrófilos e a ativação microglial no local da lesão. Os mecanismos pelos quais o óleo de copaíba exerce seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos, mas os estudos sugerem que a atenuação do recrutamento de neutrófilos e a inibição de macrófagos ocorra por mecanismo envolvendo o receptor canabinóide do tipo 2. (66). Há evidências do efeito anti-inflamatório resultante da ativação do receptor canabinóide 2 (CB2), em modelos de doenças inflamatórias clinicamente relevantes. A ativação do receptor CB2 parece exercer efeitos benéficos em doenças associadas à inflamação, estresse oxidativo e morte celular, pois evita ou diminui a ativação da microglia. Em um modelo animal de doença de Alzheimer a ativação da microglia foi completamente inibida pela administração de um agonista seletivo do receptor canbinóide CB2 (92). A presença de receptores CB2 na microglia no cérebro de paciente portador de Alzheimer sugere que o CB2 pode proporcionar um novo alvo para uma variedade de neuropatias (93). Desta forma, compostos agonistas seletivos do receptor CB2,

como é o caso do beta-cariofileno, contituem alternativas interessantes de tratamento nos processos neurodegenerativos.

Os efeitos neuroprotetores do beta-cariofileno em modelos de doenças neurodegenerativas como Parkinson (DP), Alzheimer (DA) e Huntington (DH) foram pouco explorados. Este é o primeiro estudo a demonstrar que o beta-cariofileno reduz significativamente a morte celular induzida por MPP⁺, 3-NP e AB42 nos modelos celulares que simulam os mecanismos envolvidos na DP, DH e DA, respectivamente.

A exposição ao MPP⁺ e a outras neurotoxinas ativam a caspase-3, em processo que envolve elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediada por disfunção mitocondrial. Assim, compostos capazes de reduzir a lesão induzida por EROs e inibir a ativação da caspase-3 são potenciais candidatos para o tratamento de DP e outras doenças neurodegenerativas (94, 95). Nossos resultados mostraram que o beta-cariofileno reduziu a ativação da caspase-3 induzida por MPP⁺, o que está em linha com a diminuição significativa da morte celular induzida pelo B-cariofielno no ensaio de viabilidade celular. As caspases são as principais iniciadoras e executoras dos complexos eventos bioquímicos associados à morte celular apoptótica, sendo que a ativação da caspase-3 está envolvida na execução final da apoptose (94-96).

O fator de crescimento neuronal (NGF, *nerve growth factor*) também tem sido associado à redução da morte celular por apoptose em células neuronais. Células privadas de fatores de crescimento iniciam o processo de apoptose aproximadamente 10 horas após o início da privação da sinalização trófica. O NGF promove o prolongamento de neuritos, através de um receptor específico (TrkA), também encontrado nas células PC-12 (97-100). Em nosso estudo o beta-cariofileno induziu a diferenciação em células PC12 cultivadas em meio com baixa porcentagem de soro (1%) e não induzidas com NGF. Além disso, o beta-cariofileno também apresentou efeito positivo sobre o alongamento dos neuritos formados. Nosso estudo sugere que essa indução da diferenciação celular pelo beta-cariofileno esteja associada ao aumento da expressão de proteínas neurotípicas envolvidas na neuritogênese (GAP43) e na sinaptogênese (sinaptofisina e sinapsina I). Estas proteínas tem sido associadas à diferenciação celular e ao crescimento de neuritos em células PC12 induzidas com NGF (69). A sinaptofisina e a sinapsina são proteínas associadas à membrana pré-sináptica e regulam a fusão das vesículas

sinápticas e a liberação de neurotransmissores (69). A sinaptofisina I é conhecida por induzir o aumento do número e a densidade das sinapses neuronais, sendo, também, um indicador de plasticidade estrutural e de transmissão neuronal, com efeito positivo na função cognitiva (Zhang et al, 2014). Esses resultados sugerem um possível efeito do beta-cariofileno na regeneração da rede de neuritos perdida no processo neurodegenerativo.

Além do potencial de induzir diferenciação celular no modelo neuronal, nosso estudo também abordou o efeito neuroprotetor do beta-cariofileno nos modelos de neurodegeneração. O desenvolvimento do sistema nervoso envolve a expressão coordenada de eventos celulares específicos incluindo proliferação, diferenciação, migração, crescimento de neuritos, sinaptogênese, mielinização e morte programada (101, 102). Alterações mediadas por agentes neurotóxicos sobre um ou mais destes processos afetam potencialmente o desenvolvimento do sistema nervoso (103). Nossos resultados mostraram que as neurotoxinas MPP⁺, AB42 e 3-NP inibem a diferenciação das células PC-12, verificado pelo reduzido número de células com neuritos, o que contribui para a disfunção sináptica. Além disso, mostramos que a presença do beta-cariofileno nesses modelos de neurodegeneração minimiza a inibição do crescimento de neuritos causada por estas neurotoxinas. Observamos que beta-cariofileno 10µM reduziu a inibição do crescimento de neuritos induzida pelo MPP⁺ por 144 horas, enquanto que beta-cariofileno 50µM teve efeito significativo até 96 horas. Devido a esses achados, nos outros dois modelos avaliamos o efeito do beta-cariofileno na concentração de 10µM. No modelo de Huntington e no modelo de Alzheimer, o beta-cariofileno 10 µM apresentou efeito protetor com relação à diferenciação celular até 72 horas de incubação.

Outra abordagem utilizada no estudo de substâncias antioxidantes é a técnica da medida dos spins dos elétrons não pareados presentes em líquidos ou sólidos por espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR) (104, 105). A atividade antioxidante do beta-cariofileno já foi demonstrada em microssomas de fígado de ratos. O estudo demonstrou a inibição da peroxidação lipídica e sugeriu que o mecanismo antioxidante envolvia sequestro de radicais hidroxila e de ânions superóxido (106). Porém, em nosso estudo, o beta-cariofileno não foi possível observar o efeito antioxidante do beta-cariofileno no ensaio de espectroscopia de ESR. Para avaliar a capacidade antioxidante do beta-cariofileno por ESR, foram

utilizados (a) o radical livre DPPH e (b) o spin trap DMPO. No primeiro procedimento foi medida a capacidade do beta-cariofileno (em diferentes concentrações) de neutralizar o radical livre DPPH e no segundo procedimento foi utilizada a técnica do spin-trapping, para medir a atividade neutralizadora do beta-cariofileno contra o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Nesta última técnica, a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} \bullet + \text{HO}$) gera o radical hidroxila, e o spin trap DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido) o intercepta, levando à formação do aduto do spin DMPO-OH (104). A capacidade antioxidante do beta-cariofileno não pode ser observada por meio da espectroscopia de ESR com o radical livre estável DPPH e nem com o spin trap DMPO (dados não mostrados), pois não houve redução da intensidade do sinal de ESR na presença de beta-cariofileno (0-10 mM). Resultados semelhantes foram observados por outros autores, os quais relataram que o beta-cariofileno falhou como sequestrador de DPPH, e no entanto, foi capaz de reduzir a formação de lipoperóxidos pela 5-lipoxigenase *in vitro* (107).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O presente estudo a demonstrou a atividade neuroprotetora do beta-cariofileno contra as neurotoxinas MPP⁺, AB42 e 3-NP, que induzem *in vitro* mecanismos moleculares similares aos observados *in vivo* nas doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington, respectivamente.

Especificamente, o estudo demonstrou que o beta-cariofileno reduziu a morte celular nos três modelos; reduziu a atividade da executora final da apoptose (caspase-3), induzida pela neurotoxina dopaminérgica MPP⁺ e protegeu contra a inibição da diferenciação celular nos três modelos. Adicionalmente, o beta-cariofileno induziu a diferenciação celular e aumentou a expressão de proteínas neurotípicas em células PC12 não expostas ao NGF, efeitos ainda não relatados na literatura científica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Dutta S, Singh G, Sreejith S, Mamidi MK, Husin JM, Datta I, et al. Cell therapy: the final frontier for treatment of neurological diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013 Jan;19(1):5-11. PubMed PMID: 23253099.
2. Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews Neuroscience*. 2006 Apr;7(4):278-94. PubMed PMID: 16552414. Pubmed Central PMCID: 3710114.
3. Melo A, Monteiro L, Lima RM, Oliveira DM, Cerqueira MD, El-Bacha RS. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2011;2011:467180. PubMed PMID: 22191013. Pubmed Central PMCID: 3236428.
4. Ang ET, Tai YK, Lo SQ, Seet R, Soong TW. Neurodegenerative diseases: exercising toward neurogenesis and neuroregeneration. *Frontiers in aging neuroscience*. 2010;2. PubMed PMID: 20725635. Pubmed Central PMCID: 2917219.
5. Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:151-70. PubMed PMID: 18039111.
6. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet*. 1994 Sep 17;344(8925):796-8. PubMed PMID: 7916079.
7. Sheikh S S, Haque E, Mir S.S. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *J Neurodegenerative Dis*. 2013;2013(Article ID 563481):8.
8. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: What is it and where are we? *Journal of Clinical Investigation*. 2003 Jan;111(1):3-10. PubMed PMID: ISI:000180227600001. English.
9. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2006 Jun;5(6):525-35. PubMed PMID: 16713924.
10. Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*. 2009 May 26;72(21 Suppl 4):S1-136. PubMed PMID: 19470958.

11. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011 May;26(6):1049-55. PubMed PMID: 21626550. Epub 2011/06/01. eng.
12. Somayajulu-Nitu M, Sandhu JK, Cohen J, Sikorska M, Sridhar TS, Matei A, et al. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and parkinsonism in adult rats: neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of coenzyme Q10. *BMC Neurosci.* 2009;10:88. PubMed PMID: 19635141. Pubmed Central PMCID: 2724477.
13. Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *The European journal of neuroscience.* 2008 Jun;27(11):2803-20. PubMed PMID: 18588526.
14. Lee ST, Kim M. Aging and neurodegeneration. Molecular mechanisms of neuronal loss in Huntington's disease. *Mechanisms of ageing and development.* 2006 May;127(5):432-5. PubMed PMID: 16527334.
15. Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, Langbehn DR, Long JD, Warner JH, et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature reviews Neurology.* 2014 Apr;10(4):204-16. PubMed PMID: 24614516.
16. Landles C, Bates GP. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO reports.* 2004 Oct;5(10):958-63. PubMed PMID: 15459747. Pubmed Central PMCID: 1299150.
17. van der Burg JM, Bjorkqvist M, Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *The Lancet Neurology.* 2009 Aug;8(8):765-74. PubMed PMID: 19608102.
18. Vonsattel JP. Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica.* 2008 Jan;115(1):55-69. PubMed PMID: 17978822. Pubmed Central PMCID: 2847401.
19. Tanzi RE, Bertram L. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron.* 2001 Oct 25;32(2):181-4. PubMed PMID: 11683989.
20. Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. Alzheimer disease--when and why? *Nature genetics.* 1998 Aug;19(4):314-6. PubMed PMID: 9697686.
21. Feldman H, Gauthier S, Hecker J, Vellas B, Hux M, Xu Y, et al. Economic evaluation of donepezil in moderate to severe Alzheimer disease. *Neurology.* 2004 Aug 24;63(4):644-50. PubMed PMID: 15326236.

-
22. Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu XW, Smith MA, et al. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2006:-. PubMed PMID: ISI:000242093600001. English.
23. Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, Mancuso M. Mitochondria and neurodegeneration. *Bioscience Reports*. 2007 Jun;27(1-3):87-104. PubMed PMID: ISI:000247256300009. English.
24. Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*. 2004 Jul:S2-S9. PubMed PMID: ISI:000223202100002. English.
25. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*. 2004 Jul:S18-S25. PubMed PMID: ISI:000223202200004. English.
26. Zhao BL. Natural antioxidants for neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*. 2005;31(1-3):283-93. PubMed PMID: ISI:000230119900022. English.
27. Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*. 2005 Jun 15;233(1-2):145-62. PubMed PMID: ISI:000230060500024. English.
28. Swerdlow RH. Treating neurodegeneration by modifying mitochondria: Potential solutions to a "complex" problem. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007 Oct;9(10):1591-603. PubMed PMID: ISI:000249521600004. English.
29. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006 Oct 19;443(7113):787-95. PubMed PMID: ISI:000241362700038. English.
30. Paliwal R, Rai S, Vaidya B, Mahor S, Gupta PN, Rawat A, et al. Cell-selective mitochondrial targeting: progress in mitochondrial medicine. *Curr Drug Deliv*. 2007 Jul;4(3):211-24. PubMed PMID: 17627495. Epub 2007/07/14. eng.
31. Trushina E, McMurray CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience*. 2007 Apr 14;145(4):1233-48. PubMed PMID: ISI:000246159700006. English.
32. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007. xxxvi, 851 p. p.

33. Gutteridge JM. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Nov 17;738:201-13. PubMed PMID: 7832429. Epub 1994/11/17. eng.
34. Barbosa LF, Medeiros MHG, Augusto O. Oxidative damage and neurodegeneration. What have we learned from transgenic and knockout animals? *Quimica Nova*. 2006 Nov-Dec;29(6):1352-60. PubMed PMID: ISI:000242341600034. Portuguese.
35. Clemens JA, Panetta JA. Neuroprotection by antioxidants in models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Nov 17;738:250-6. PubMed PMID: 7832435. Epub 1994/11/17. eng.
36. Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 1996 Jan;48(1):1-19. PubMed PMID: 8830346. Epub 1996/01/01. eng.
37. Robberecht W, Van den Bosch L. The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Research Communications*. 1998 Sep-Oct;23(2):67-75. PubMed PMID: ISI:000076684000001. English.
38. Shi YG. Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure*. 2002 Mar;10(3):285-8. PubMed PMID: ISI:000174409600003. English.
39. Yan N, Shi YG. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005;21:35-56. PubMed PMID: ISI:000234092700003. English.
40. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in cell biology*. 1998 Aug;8(8):324-30. PubMed PMID: 9704409.
41. Chen ZA, Wang JL, Liu RT, Ren JP, Wen LQ, Chen XJ, et al. Liquiritin potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. *Cytotechnology*. 2009 Jul;60(1-3):125-32. PubMed PMID: 19789989. Pubmed Central PMCID: 2780551. Epub 2009/10/01. eng.
42. Berger-Sweeney J, Hohmann CF. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behav Brain Res*. 1997 Jul;86(2):121-42. PubMed PMID: 9134147. Epub 1997/07/01. eng.
43. Webb SJ, Monk CS, Nelson CA. Mechanisms of postnatal neurobiological development: implications for human development. *Dev Neuropsychol*. 2001;19(2):147-71. PubMed PMID: 11530973. Epub 2001/09/04. eng.

44. Daniele S, Lecca D, Trincavelli ML, Ciampi O, Abbracchio MP, Martini C. Regulation of PC12 cell survival and differentiation by the new P2Y-like receptor GPR17. *Cell Signal*. 2010 Apr;22(4):697-706. PubMed PMID: 20056144. Epub 2010/01/09. eng.
45. Radio NM, Breier JM, Shafer TJ, Mundy WR. Assessment of chemical effects on neurite outgrowth in PC12 cells using high content screening. *Toxicol Sci*. 2008 Sep;105(1):106-18. PubMed PMID: 18539913. Epub 2008/06/10. eng.
46. Slotkin TA, Seidler FJ. Oxidative stress from diverse developmental neurotoxicants: antioxidants protect against lipid peroxidation without preventing cell loss. *Neurotoxicol Teratol*. 2010 Mar-Apr;32(2):124-31. PubMed PMID: 20004241. Pubmed Central PMCID: 2838986. Epub 2009/12/17. eng.
47. Eik LF, Naidu M, David P, Wong KH, Tan YS, Sabaratnam V. *Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden: A Medicinal Mushroom That Stimulates Neurite Outgrowth in PC-12 Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2012;2012:320308. PubMed PMID: 22203867. Pubmed Central PMCID: 3235797.
48. Gottlieb PA, Barone T, Sachs F, Plunkett R. Neurite outgrowth from PC12 cells is enhanced by an inhibitor of mechanical channels. *Neurosci Lett*. 2010 Jun 26. PubMed PMID: 20600595. Epub 2010/07/06. Eng.
49. Di Sotto A, Mazzanti G, Carbone F, Hrelia P, Maffei F. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutation research*. 2010 Jun 17;699(1-2):23-8. PubMed PMID: 20398787.
50. Robles M, Aregullin M, West J, Rodriguez E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta medica*. 1995 Jun;61(3):199-203. PubMed PMID: 7617758.
51. Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of natural products*. 1992 Jul;55(7):999-1003. PubMed PMID: 1402962.
52. Politeo O, Skocibusic M, Maravic A, Ruscic M, Milos M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic Dalmatian black pine (*Pinus nigra* ssp. *dalmatica*). *Chemistry & biodiversity*. 2011 Mar;8(3):540-7. PubMed PMID: 21404437.
53. Sabulal B, Dan M, J AJ, Kurup R, Pradeep NS, Valsamma RK, et al. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry*. 2006 Nov;67(22):2469-73. PubMed PMID: 16973189.

54. Veiga Junior VF RE, Carvalho MV, Henriques MG, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - a comparative study. *J Ethnopharmacol.* 2007;112:248-54.
55. Rasmann S, Kollner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature.* 2005 Apr 7;434(7034):732-7. PubMed PMID: 15815622.
56. Opdyke DL. Monographs on fragrance raw materials. Food and cosmetics toxicology. 1973 Dec;11(6):1011-81. PubMed PMID: 4206086.
57. Evaluation Summary of B-Caryophyllene for Use as a Cigarette Ingredient. U.S.A: www.pmintl-technical-productinformation.com/global/downloads/ingredients/B-caryophyllene.pdf; 2005. Available from: www.pmintl-technical-productinformation.com/global/downloads/ingredients/B-caryophyllene.pdf.
58. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell proliferation.* 2008 Dec;41(6):1002-12. PubMed PMID: 19040575.
59. Ghelardini C, Galeotti N, Salvatore G, Mazzanti G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta medica.* 1999 Dec;65(8):700-3. PubMed PMID: 10630108.
60. Shafaghat A. Antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oils from flower, leaf and stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* growing wild in north-west Iran. *Natural product communications.* 2011 Sep;6(9):1351-2. PubMed PMID: 21941913.
61. Dunkic V, Bezic N, Vuko E. Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*. *Natural product communications.* 2011 Sep;6(9):1385-8. PubMed PMID: 21941920.
62. Ho CL, Liao PC, Wang EI, Su YC. Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigemma* from Taiwan. *Natural product communications.* 2011 Sep;6(9):1357-60. PubMed PMID: 21941915.
63. Pinheiro BG, Silva AS, Souza GE, Figueiredo JG, Cunha FQ, Lahlou S, et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *Journal of ethnopharmacology.* 2011 Nov 18;138(2):479-86. PubMed PMID: 21971207.

64. Agarwal RB, Rangari VD. Phytochemical investigation and evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activities of essential oil of *Strobilanthes xiocephala* Benth. *Indian journal of experimental biology*. 2003 Aug;41(8):890-4. PubMed PMID: 15248491.
65. Kobayashi C, Fontanive TO, Enzweiler BG, de Bona LR, Massoni T, Apel MA, et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. *Pharmaceutical biology*. 2011 Mar;49(3):306-13. PubMed PMID: 21323483.
66. Guimaraes-Santos A, Santos DS, Santos IR, Lima RR, Pereira A, de Moura LS, et al. Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. *Evid-Based Compl Alt*. 2012. PubMed PMID: WOS:000301379500001. English.
67. Lee CS, Park WJ, Ko HH, Han ES. Differential involvement of mitochondrial permeability transition in cytotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine. *Mol Cell Biochem*. 2006 Sep;289(1-2):193-200. PubMed PMID: 16625421. Epub 2006/04/21. eng.
68. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 1989 May 12;119(2):203-10. PubMed PMID: 2470825.
69. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol*. 2004 May-Jun;26(3):397-406. PubMed PMID: 15113601.
70. L'Episcopo F, Serapide MF, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, et al. A Wnt1 regulated Frizzled-1/beta-Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. *Molecular neurodegeneration*. 2011;6:49. PubMed PMID: 21752258. Pubmed Central PMCID: 3162575.
71. Santos AB, Siqueira Silva, D.H., Bolzani, V.S, Santos, L.A.,Schmidt, T.M., Baffad,O. Antioxidant Properties of Plant Extracts: an EPR and DFT Comparative Study of the Reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. *J Braz Chem Soc*. 2009;20(8):1483-92.
72. Greene LA. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *The Journal of cell biology*. 1978 Sep;78(3):747-55. PubMed PMID: 701359. Pubmed Central PMCID: 2110184.

73. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976 Jul;73(7):2424-8. PubMed PMID: 1065897. Pubmed Central PMCID: 430592.
74. Yin WL, He JQ, Hu B, Jiang ZS, Tang XQ. Hydrogen sulfide inhibits MPP(+)-induced apoptosis in PC12 cells. *Life Sci*. 2009 Aug 12;85(7-8):269-75. PubMed PMID: 19540852. Epub 2009/06/23. eng.
75. Lee CS, Han ES, Lee WB. Antioxidant effect of phenelzine on MPP+-induced cell viability loss in differentiated PC12 cells. *Neurochem Res*. 2003 Dec;28(12):1833-41. PubMed PMID: 14649725. Epub 2003/12/03. eng.
76. Fu Q, Dai H, Hu W, Fan Y, Shen Y, Zhang W, et al. Carnosine protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2008 Feb;28(2):307-16. PubMed PMID: 18027086. Epub 2007/11/21. eng.
77. Muthaiyah B, Essa MM, Chauhan V, Chauhan A. Protective effects of walnut extract against amyloid beta peptide-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Neurochem Res*. 2011 Nov;36(11):2096-103. PubMed PMID: 21706234. Pubmed Central PMCID: 3183245. Epub 2011/06/28. eng.
78. Gines S, Seong IS, Fossale E, Ivanova E, Trettel F, Gusella JF, et al. Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum Mol Genet*. 2003 Mar 1;12(5):497-508. PubMed PMID: 12588797. Epub 2003/02/18. eng.
79. Marongiu ME, Piccardi MP, Bernardi F, Corsini GU, Del Zompo M. Evaluation of the toxicity of the dopaminergic neurotoxins MPTP and MPP+ in PC12 pheochromocytoma cells: binding and biological studies. *Neurosci Lett*. 1988 Dec 5;94(3):349-54. PubMed PMID: 3264604. Epub 1988/12/05. eng.
80. Itano Y, Kitamura Y, Nomura Y. Biphasic effects of MPP+, a possible parkinsonism inducer, on dopamine content and tyrosine hydroxylase mRNA expression in PC12 cells. *Neurochem Int*. 1995 Feb;26(2):165-71. PubMed PMID: 7599536. Epub 1995/02/01. eng.
81. Hasegawa E, Asagami H, Kang D, Minakami S, Takeshige K. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) inhibits mitochondrial oxygen consumption mediated by succinate as well as malate in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Mol Biol Int*. 1995 Feb;35(2):409-13. PubMed PMID: 7663396. Epub 1995/02/01. eng.

82. Kim-Han JS, Antenor-Dorsey JA, O'Malley KL. The Parkinsonian mimetic, MPP+, specifically impairs mitochondrial transport in dopamine axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011 May 11;31(19):7212-21. PubMed PMID: 21562285. Pubmed Central PMCID: 3140916. Epub 2011/05/13. eng.
83. Fagarasan MO, Aisen PS. IL-1 and anti-inflammatory drugs modulate A beta cytotoxicity in PC12 cells. *Brain research*. 1996 Jun 3;723(1-2):231-4. PubMed PMID: 8813406. Epub 1996/06/03. eng.
84. Abdipranoto A, Wu S, Stayte S, Vissel B. The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008 Apr;7(2):187-210. PubMed PMID: 18537646. Epub 2008/06/10. eng.
85. Li XD, Buccafusco JJ. Effect of beta-amyloid peptide 1-42 on the cytoprotective action mediated by alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in growth factor-deprived differentiated PC-12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Nov;307(2):670-5. PubMed PMID: 12970390. Epub 2003/09/13. eng.
86. Kim JH, Kim S, Yoon IS, Lee JH, Jang BJ, Jeong SM, et al. Protective effects of ginseng saponins on 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration in rats. *Neuropharmacology*. 2005 Apr;48(5):743-56. PubMed PMID: 15814108.
87. Chen LW, Horng LY, Wu CL, Sung HC, Wu RT. Activating mitochondrial regulator PGC-1alpha expression by astrocytic NGF is a therapeutic strategy for Huntington's disease. *Neuropharmacology*. 2012 Sep;63(4):719-32. PubMed PMID: 22633948.
88. PEDREIRA NE. Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de copaíba in natura (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental DMBA induzida 2007.
89. Yamaguchi MH, Garcia RF. ÓLEO DE COPAÍBA E SUAS PROPRIEDADES MEDICINAIS: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. *Revista Saúde e Pesquisa*. 2012;5(1):137-46.
90. Elmann A, Mordechay S, Rindner M, Larkov O, Elkabetz M, Ravid U. Protective Effects of the Essential Oil of *Salvia fruticosa* and Its Constituents on Astrocytic Susceptibility to Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death. *J Agric Food Chem*. 2009 Aug 12;57(15):6636-41. PubMed PMID: 19722569. Epub 2009/09/03. eng.

91. Klauke AL, Racz I, Pradier B, Markert A, Zimmer AM, Gertsch J, et al. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2014 Apr;24(4):608-20. PubMed PMID: 24210682.
92. Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci*. 2005 Feb 23;25(8):1904-13. PubMed PMID: 15728830.
93. Ashton JC, Glass M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Current neuropharmacology*. 2007;5(2):73-80. PubMed PMID: 18615177. Pubmed Central PMCID: 2435344.
94. Wang MS, Boddapati S, Emadi S, Sierks MR. Curcumin reduces alpha-synuclein induced cytotoxicity in Parkinson's disease cell model. *BMC Neurosci*. 2010;11:57. PubMed PMID: 20433710. Pubmed Central PMCID: 2879277. Epub 2010/05/04. eng.
95. Lo YC, Shih YT, Tseng YT, Hsu HT. Neuroprotective Effects of San-Huang-Xie-Xin-Tang in the MPP(+)/MPTP Models of Parkinson's Disease In Vitro and In Vivo. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2012;2012:501032. PubMed PMID: 22474505. Pubmed Central PMCID: 3303814. Epub 2012/04/05. eng.
96. Carange J, Longpre F, Daoust B, Martinoli MG. 24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *J Toxicol*. 2011;2011:392859. PubMed PMID: 21776258. Pubmed Central PMCID: 3135132. Epub 2011/07/22. eng.
97. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology and teratology*. 2004 May-Jun;26(3):397-406. PubMed PMID: 15113601. Epub 2004/04/29. eng.
98. Itoh K, Ishima T, Kehler J, Hashimoto K. Potentiation of NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells by papaverine: Role played by PLC-gamma, IP(3) receptors. *Brain research*. 2011 Mar 4;1377:32-40. PubMed PMID: 21211516. Epub 2011/01/08. eng.

99. Shimoike K, Sasaya H, Ikeuchi T. Analysis of the role of nerve growth factor in promoting cell survival during endoplasmic reticulum stress in PC12 cells. *Methods in enzymology*. 2011;490:53-70. PubMed PMID: 21266243. Epub 2011/01/27. eng.
100. Wlozin B, Behl C. Mechanisms of neurodegenerative disorders: Part 2: control of cell death. *Arch Neurol*. 2000 Jun;57(6):801-4. PubMed PMID: 10867776. Epub 2000/06/27. eng.
101. Cowan JM, Dayal Y, Schwaitzberg S, Tischler AS. Cytogenetic and immunohistochemical analysis of an adult anaplastic neuroblastoma. *Am J Surg Pathol*. 1997 Aug;21(8):957-63. PubMed PMID: 9255260. Epub 1997/08/01. eng.
102. Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, Sanes JR. Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*. 2005 Oct;132(20):4471-81. PubMed PMID: 16162647. Epub 2005/09/16. eng.
103. Barone S, Jr., Das KP, Lassiter TL, White LD. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology*. 2000 Feb-Apr;21(1-2):15-36. PubMed PMID: 10794382. Epub 2000/05/04. eng.
104. Santos ABd, Silvall; DHS, Bolzanill; VdS, SantosII; LÁ, Baffal TMSO. Antioxidant properties of plant extracts: an EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and spin trap DMPO. *J Braz Chem Soc*. 2009;20(8).
105. Takahashi S, Brunel LC, Edwards DT, van Tol J, Ramian G, Han S, et al. Pulsed electron paramagnetic resonance spectroscopy powered by a free-electron laser. *Nature*. 2012 Sep 20;489(7416):409-13. PubMed PMID: 22996555. Epub 2012/09/22. eng.
106. Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, et al. The antioxidant effect of beta-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *Br J Nutr*. 2013 May 1:1-8. PubMed PMID: 22717234. Epub 2012/06/22. Eng.
107. Calleja MA, Vieites JMa, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, et al. The antioxidant effect of b-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British Journal of Nutrition* 2013;109:394-401.