

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

RENATA MELO DOS SANTOS ONO

Caracterização dos efeitos de neuroproteção e neurodiferenciação de novos compostos inibidores de acetilcolinesterase em células PC12 diferenciadas em neurônios

Ribeirão Preto – SP

2022

RENATA MELO DOS SANTOS ONO

Caracterização dos efeitos de neuroproteção e neurodiferenciação de novos compostos inibidores de acetilcolinesterase em células PC12 diferenciadas em neurônios

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Área de concentração: Genética.

Orientadora:

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

Ribeirão Preto – SP
2022

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Ono, Renata Melo dos Santos

Caracterização dos efeitos de neuroproteção e neurodiferenciação de novos compostos inibidores de acetilcolinesterase em células PC12 diferenciadas em neurônios

86f. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Genética. Orientadora *Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi*.

1. Doença de Alzheimer; 2. Inibidores de acetilcolinesterase; 3. Híbridos donepezilatacrina; 4. Neurodiferenciação; 5. Neuroproteção.

Nome: Ono, Renata Melo dos Santos

Título: Caracterização dos efeitos de neuroproteção e neurodiferenciação de novos compostos inibidores de acetilcolinesterase em células PC12 diferenciadas

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

Área de concentração: Genética.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. Nº 2018/21.709-1).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –Brasil (CNPq) (Proc. Nº 309854/2017-2; Proc. Nº 311533/2021-3; bolsa de mestrado, Proc. Nº 832364/1999-1)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA)

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

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

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pela confiança depositada em mim desde o primeiro momento em que visitei o laboratório. Por toda a sua disponibilidade para me orientar a desenvolver uma ciência de qualidade e por todos os incentivos, ensinamentos e correções, que contribuíram imensamente para o meu amadurecimento. **Muito obrigada.**

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi** pelo seu apoio, palavras de encorajamento e alegria que ela proporciona ao nosso laboratório.

À **Profa. Dra. Ivone Carvalho** e a **Dra. Talita Perez Cantuaria Chierrito**, pela colaboração e por terem cordialmente cedido os compostos AChEIs.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo Silva Passos Junior** e à **Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões**, por gentilmente permitirem a utilização de equipamentos dos seus laboratórios.

À **Profa. Dra. Ester Silveira Ramos** chefe de departamento e vice-coordenadora do programa de Pós-Graduação em de Genética da FMRP-USP, pelo seu apoio.

Ao **Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder** coordenador do programa Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP pela sua flexibilidade e por estar sempre disposto a apoiar os alunos da pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Genética da FMRP-USP, **Susie A.Nalon**, **Gustavo Medeiros**, **Maria Oliveira** e **Francisca Pereira** pela atenção e apoio prestados.

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

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

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

À **FAPESP**, **CAPES** e **FAEPA** pelo apoio financeiro dado a esse projeto.

Ao **Luiz Augusto da Costa Junior** pelo auxílio para realização desse projeto, além da sua companhia, conversas, conselhos e pelo café de cada dia.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese: **Larissa Piassi, Jéssica Ellen e Gustavo Siconello**, pela amizade, parceria, incentivo, pelos ensinamentos e risadas. Agradeço à **Natália Chermont**, por além da sua amizade ter se dedicado e me ensinado muito durante a realização desse projeto de mestrado. As alunas de iniciação científica **Laísa Rocha, Thayná Flores e Alice Vitória** pelo companheirismo. Agradeço a todos por terem me recebido de braços abertos antes mesmo de eu fazer parte do laboratório, a amizade de vocês foi sempre um incentivo a mais para a realização desse projeto.

À **Prof. Dra Lília Moreira**, à **Mônica Jacobina** e aos amigos da UFBA, por me fazerem amar mais a genética e me incentivarem a vir para FMRP-USP para seguir esse caminho.

Ao meu pai **Joaquim Junior**, por sempre me incentivar a estudar e dar todo o apoio necessário para que eu pudesse cumprir meus objetivos. A minha mãe **Suely Melo**, que além de todo o apoio e incentivo, sempre me proporcionou um ambiente saudável e de paz, para que eu pudesse me dedicar aos estudos. Ao meu irmão **Thales Santos** por ser uma companhia incrível e sempre torcer por mim. Sem eles nada disso teria sido possível.

Ao meu marido **Nicholas Ono**, por ser o meu maior incentivador, independente dos sacrifícios que precise fazer. Por estar constantemente ao meu lado e ser o porto seguro para o qual eu retorno todos os dias, seja nos mais tranquilos ou nos mais turbulentos.

À minha família por sempre me apoiar, especialmente a **Sandra Melo** por ser uma inspiração acadêmica e por todo incentivo. À família agregada, os meus sogros **Sue e Eduardo Ono**, meus cunhados **Sophia e Eduardo Xavier**, e a família de Ribeirão Preto, por terem me recebido com tanto amor, sobretudo os avós **Cleire Magosso, Makoto e Edméa Ono**.

Aos meus amigos da **IBVA** por me incentivarem a cumprir o propósito de vir para Ribeirão, mesmo que isso significasse estar distante deles. E aos meus amigos da **IBL**, que se tornarão uma família pra mim, me receberam com muito carinho e fizeram com que Ribeirão Preto se tornasse minha casa.

Por fim, agradeço a **Deus**, porque por Ele, por meio dEle e para Ele são todas as coisas, sem Ele eu nada seria.

RESUMO

Ono, R.M.S. (2022). **Caracterização dos efeitos de neuroproteção e neurodiferenciação de novos compostos inibidores de acetilcolinesterase em células PC12 diferenciadas em neurônios**. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa causada por danos progressivos que comprometem as funções cognitivas, comportamento e memória. A DA se desenvolve devido a diversas alterações culminando na morte de neurônios; entre essas alterações, destacam-se o acúmulo de peptídeos beta-amiloide, hiperfosforilação da proteína tau, estresse oxidativo e redução nos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Os tratamentos atualmente empregados para a DA são os inibidores de acetilcolinesterase (AChEIs), enzima responsável pela degradação da ACh, porém, estes apresentam eficácia limitada e efeitos colaterais para alguns pacientes sob uso prolongado. Nesse contexto, novos compostos híbridos da classe dos AChEIs foram sintetizados a partir de donepezila e tacrina, os quais são fármacos utilizados no tratamento da DA; tais compostos híbridos, TAHB3 e TA8Amino, têm sido estudados no presente laboratório, sob a hipótese de que possam apresentar capacidade neuroprotetora frente a danos oxidativos, além de induzir a neurodiferenciação. O objetivo do trabalho foi analisar os efeitos neuroprotetores de TAHB3 e TA8Amino em células PC12 diferenciadas em neurônios, frente a danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de analisar a capacidade destes em induzir a neurodiferenciação das células PC12. Para avaliar a capacidade indutora de neurodiferenciação, as células foram tratadas durante 7 dias com os compostos AChEIs em concentração próxima ao IC_{50} , 5 μM para os compostos híbridos e 10 μM para donepezila e tacrina. A neurodiferenciação foi avaliada por meio de análises morfológicas e quantitativas da porcentagem de diferenciação neuronal (comprovada pela expressão de marcadores neuronais por imunofluorescência e *Western Blot*), bem como análise do comprimento de neuritos. Para analisar o potencial neuroprotetor dos compostos, as células PC12 foram diferenciadas em neurônios, utilizando *Neuronal Growth Factor* – NGF durante 7 dias; após esse período, as células foram pré-tratadas com os AChEIs e depois submetidas à ação do H_2O_2 . A porcentagem de viabilidade celular (ensaio do XTT), alteração da cinética do ciclo celular e indução de morte por apoptose e necrose (citometria de fluxo), foram avaliadas. Os resultados obtidos demonstraram que o composto TAHB3 foi capaz de induzir a neurodiferenciação das células PC12, havendo alterações morfológicas neuro-específicas, bem como aumento significativo na expressão do marcador neuronal β -III-tubulina. Nos ensaios de neuroproteção, nenhum dos compostos (TAHB3, TA8Amino, donepezila e tacrina) foi citotóxico para os neurônios diferenciados, sendo que testados isoladamente não reduziram a viabilidade e nem alteraram a cinética do ciclo celular; TAHB3 foi o único composto que exibiu potencial neuroprotetor frente aos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 . Quanto à análise de indução de morte celular, observou-se que os tratamentos com os compostos

isoladamente não aumentaram os níveis de morte; já em relação à neuroproteção, não foram obtidas diferenças significativas. Dessa forma, os resultados obtidos são interessantes e demonstram que o composto híbrido TAHB3 apresenta propriedades importantes na busca por novos candidatos a fármacos na terapia para a DA, por não ser citotóxico para as células PC12 diferenciadas em neurônios, além de apresentar potencial neuroprotetor frente a danos oxidativos e capacidade indutora de neurodiferenciação.

Palavras Chave: Doença de Alzheimer. Inibidores de acetilcolinesterase. Híbridos donepezila-tacrina. Neurodiferenciação. Neuroproteção.

ABSTRACT

Ono, R.M.S. (2022). **Characterization of neuroprotective and neurodifferentiation effects of new acetylcholinesterase inhibitors in PC12 neuron-differentiated cells.** (Dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease caused by progressive damage that compromises cognitive functions, behavior and memory. AD development may be due to several changes culminating in neuronal death. Among these alterations, the accumulation of beta-amyloid peptides, hyperphosphorylation of tau protein, oxidative stress and reduced levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) stand out. The treatments currently used for AD are based on acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs); AChE is the enzyme responsible for the degradation of ACh. In this context, new hybrid compounds belonging to the AChEIs class were synthesized from donepezil and tacrine, which are drugs used in AD therapy. The hybrid compounds, TAHB3 and TA8Amino, have been studied in the present laboratory, under the hypothesis that they may have a neuroprotective capacity against oxidative damage, in addition to inducing neurodifferentiation. The aim of this work was to analyze the neuroprotective effects of TAHB3 and TA8Amino on PC12 cells, which were differentiated into neurons, against oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H₂O₂), in addition to analysing their ability to induce the neurodifferentiation of PC12 cells. To assess the neurodifferentiation-inducing capacity, cells were treated for 7 days with AChEIs at a concentration close to the IC₅₀, 5 µM for the hybrid compounds, and 10 µM for donepezil and tacrine. Neurodifferentiation was evaluated through morphological and quantitative analyses of the percentages of neuronal differentiation (proven by the expression of neuronal markers by immunofluorescence and Western Blot), as well as neurite length measurements. To evaluate the neuroprotective potential of the compounds, PC12 cells were differentiated into neurons using Neuronal Growth Factor – NGF for 7 days; after this, the cells were pre-treated with AChEIs and then subjected to treatment with H₂O₂. The cell viability (XTT assay), cell cycle kinetics and induction of cell death (by apoptosis and necrosis) were evaluated. The results showed that the TAHB3 compound was able to induce the neurodifferentiation of PC12 cells, with neurospecific morphological changes, as well as a significant increase in the expression of the β-III-tubulin neuronal marker. In neuroprotection assays, none of the compounds (TAHB3, TA8Amino, donepezil and tacrine) was cytotoxic to differentiated neurons, and when tested alone they did not reduce cell viability or change the cell cycle kinetics; TAHB3 was the only compound that exhibited neuroprotective potential against oxidative damage induced by H₂O₂. As for the analysis of cell death induction, it was observed that treatments with the compounds alone did not increase the levels of death; however, regarding neuroprotection, significant differences were not found. Thus, the results obtained are interesting and demonstrate that the hybrid compound TAHB3 has important properties in the search for new drug candidates in AD therapy, since this compound was not toxic to neuron-differentiated PC12 cells, in addition to presenting neuroprotective potential against oxidative damage and neurodifferentiation-inducing capacity.

Keywords: Alzheimer's Disease. Acetylcholinesterase inhibitors. Donepezil-tacrine hybrids. Neurodifferentiation. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estratégia de hibridização aplicada à síntese de novos compostos híbridos inibidores de acetilcolinesterase (AChEIs) a partir da donepezila e tacrina (dados extraídos de Chierrito, et al., 2017).....29
- Figura 2:** Representação das estruturas moleculares dos compostos AChEIs com seus respectivos valores de 50% da ação inibitória máxima (IC_{50}). Compostos originais donepezila e tacrina e os novos compostos híbridos TAHB3 e TA8Amino (dados extraídos de Chierrito, et al., 2017).....30
- Figura 3:** Protocolo para ensaios de neuroproteção. Após a diferenciação das células PC12 em neurônios maduros, estas foram pré-tratadas com os compostos AChEIs, seguindo o tratamento com o H_2O_2 para a indução de danos no DNA. Após 24 h de recuperação, as análises de viabilidade celular, cinética do ciclo e indução de morte celular foram realizadas. MD (Meio de diferenciação) contendo meio de cultura completo DMEM/F10 + 10% SBF + NGF 50 ng/mL.....40
- Figura 4:** Figura 4: Neurodiferenciação das células PC12 submetidas a 7 dias de tratamento em meio DMEM/F10 + 10% SBF, (A) sem ou (B) com NGF (50 ng/mL). As alterações morfológicas associadas à neurodiferenciação foram observadas em microscópio invertido (*EVOS XL Core- Invitrogen*), sob ampliação de 40x.....45
- Figura 5:** Imunofluorescência de marcadores neuro-específicos nas células PC12 após 7 dias de diferenciação com o NGF (50 ng/ml) (A) Células PC12 Indiferenciadas marcadas com anti-Nestin (1:500) e coloração Hoechst 33342 (0,5 μ g/mL). (B) Células PC12 diferenciadas em neurônios, mostrando a marcação com anti- β -III-tubulina (1:500) e coloração Hoechst 33342 (0,5 μ g/mL). (C) Células PC12 diferenciadas em neurônios mostrando a marcação com anti-MAP2 (1:500) e coloração Hoechst 33342 (0,5 μ g/mL). Alterações morfológicas foram observadas em aumento de 20x usando um microscópio de fluorescência Zeiss (*Axio Imager*).....46

Figura 6: Quantificação de células após a neurodiferenciação por NGF em células da linhagem PC12. (A) Porcentagem de células diferenciadas após 7 dias de tratamento com NGF em comparação ao controle negativo; foram consideradas diferenciadas as células que apresentassem pelo menos um neurito com comprimento maior do que o diâmetro do corpo celular. (B) Análise do comprimento dos neuritos (μm) após o tratamento com o NGF em comparação com o controle negativo; foram analisadas aleatoriamente 100 células, utilizando o software *ImageJ (Fiji)*. A análise estatística foi realizada pelo teste- *t*. Valores expressos em média \pm EP. *** $p < 0,001$ indica diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos de células diferenciadas e não diferenciadas.....47

Figura 7: Análise da diferenciação neuronal nas células PC12. (A) Expressão de proteínas β -III-tubulina (~55 kDa) e β -actina (~45 kDa) analisadas por *Western blotting* antes e após diferenciação neuronal. (B) Níveis de expressão de β -III-tubulina nas células indiferenciadas e diferenciadas. Os valores foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o software *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Três experimentos independentes foram realizados, sendo a análise estatística realizada pelo teste-*t*. Os dados são expressos como média \pm EP. * $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos de células diferenciadas e indiferenciadas.49

Figura 8: Células da linhagem PC12 após 7 dias de tratamento com os compostos AChEIs, na seguinte ordem: (A) Células PC12 indiferenciadas (controle negativo) (B) Tratamento com NGF 50 ng/mL (Controle positivo) (C) Tratamento com TAHB3 (5 μM) (D) Tratamento com TA8Amino (5 μM) (E) Tratamento com donepezila (10 μM) (F) Tratamento com tacrina (10 μM). As alterações morfológicas associadas à neurodiferenciação, como formação de neuritos (indicados por setas), redução do citoplasma e do número de células em divisão, foram observadas em microscópio invertido (*EVOS XL Core- Invitrogen*), sob ampliação de 40x.50

Figura 9: Imunofluorescência do marcador neuronal β -III-tubulina nas células PC12 tratadas com os AChEIs, mostrando a marcação com β -III-tubulina (1:500), e coloração Hoechst-33342 nuclear (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Alterações morfológicas foram

observadas em aumento de 20x usando um microscópio de fluorescência *Zeiss (Axio Imager)*. Tratamentos: Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo: células indiferenciadas); NGF 50 ng/mL (controle positivo); composto TAHB3 (5 µM); TA8Amino (5 µM); donepezila (10 µM); tacrina (10 µM).....52

Figura 10: Imunofluorescência do marcador neuronal β -III-tubulina nas células PC12 tratadas com os AChEIs, mostrando a marcação com β -III-tubulina (1:500), e coloração Hoechst-33342 nuclear (0,5 µg/mL). Alterações morfológicas foram observadas em aumento de 20x usando um microscópio de *fluorescência Zeiss (Axio Imager)*. Tratamentos: Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo: células indiferenciadas); NGF 50 ng/mL (controle positivo); composto TAHB3 (5 µM); TA8Amino (5 µM); donepezila (10 µM); tacrina (10 µM).....54

Figura 11: Diferenciação neuronal induzida pelos AChEI nas células PC12. (A) Expressão de proteínas β -III-tubulina (-55 kDa) e β -actina (-45 kDa) analisadas por *Western blotting*. (B) Os níveis de expressão de β -III-tubulina após 7 dias de tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Três experimentos independentes foram realizados, sendo a análise estatística realizada pelo teste *One-way Anova*, com pós-teste de *Dunnet*. Os dados são expressos como média \pm EP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo: células indiferenciadas); NGF 50 ng/mL (controle positivo); composto TAHB3 (5 µM); TA8Amino (5 µM); donepezila (10 µM); tacrina (10 µM).....55

Figura 12: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações de H₂O₂ na linhagem celular PC12 após 2 h de tratamento e 24 h de recuperação. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Os valores foram obtidos de três experimentos independentes e estão expressos como Média \pm EP. *** $p < 0,001$, indicam diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo.56

Figura 13: Porcentagens de células PC12 diferenciadas em neurônios maduros viáveis, obtidas nos ensaios de citotoxicidade e neuroproteção frente a danos

induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Ensaio realizado utilizando o *kit-XTT* (*Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular Biochemicals*) e analisado por meio de espectrofotometria (*aparelho Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek*). Os valores são provenientes de quatro experimentos independentes e estão expressos em média ± EP. Análise estatística *One-Way Anova*, com pós-teste de *Dunnet*. ***p* < 0,005, *** *p* < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo. # *p* < 0,05, indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle positivo. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo); *Neuronal Growth Factor* 50 ng/mL (NGF, controle positivo); composto TAHB3 (5 µM); TA8Amino (5 µM); donepezila (10 µM); tacrina (10 µM).
.....58

Figura 14: Cinética do ciclo celular nas células tratadas somente com os AChEIs e nas células pré-tratadas com os AChEI, frente a danos posteriormente induzidos por H₂O₂ (150 µM). Os valores são provenientes de três experimentos independentes. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Valores expressos em média ± EP. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo); Peróxido de hidrogênio (H₂O₂, controle positivo); Dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%); composto TAHB3 (5 µM); TA8Amino (5 µM); donepezila (10 µM); tacrina (10 µM).....61

Figura 15: Análise por citometria da indução de morte celular por apoptose e necrose, frente a danos oxidativos induzidos por H₂O₂ (150 µM) e a ação dos compostos AChEI. Análise realizada utilizando o kit *Guava Nexin* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes. Análise estatística: *Two-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Valores expressos em média ± EP. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo); Peróxido de hidrogênio (H₂O₂, controle positivo); Dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%); composto TAHB3 (5 µM); TA8Amino (5 µM); donepezila (10 µM); tacrina (10 µM).....63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Porcentagem de células diferenciadas após 7 dias de tratamento com NGF em comparação ao controle negativo, além da comparação do comprimento dos neuritos (μm) entre células diferenciadas após o tratamento com o NGF e o controle negativo. Foram analisadas aleatoriamente 100 células, utilizando o software *ImageJ (Fiji)*. Análise estatística realizada por meio do teste-*t*. Valores expressos em média \pm EP.....48
- Tabela 2:** Porcentagens de células diferenciadas e comprimento dos neuritos após 7 dias de tratamento com os compostos AChEIs em comparação ao controle negativo. Foram analisadas aleatoriamente 100 células, utilizando o software *ImageJ (Fiji)*. Análise estatística realizada *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Valores expressos em média \pm EP.....52
- Tabela 3:** Níveis de expressão de β -III-tubulina após 7 dias de tratamento com os compostos AChEIs normalizados em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o software *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Três experimentos independentes foram realizados, sendo a análise estatística realizada pelo teste *One way Anova*, com pós-teste de *Dunnet*. Análise estatística realizada por meio do teste-*t*. Valores expressos em média \pm EP.....56
- Tabela 4:** Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações de H_2O_2 na linhagem celular PC12 após 2 h de tratamento e 24 h de recuperação. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*.....57
- Tabela 5:** Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes tratamentos com os compostos AChEIs nos ensaios de citotoxicidade e neuroproteção frente a danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na linhagem PC12 diferenciada em neurônios maduros. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EP.....59

Tabela 6: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo obtidas no ensaio de neuroproteção frente ao dano oxidativo induzido pelo H₂O₂ (150 μM). Análise estatística: *One-Way* Anova com pós-teste de *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EP.....62

Tabela 7: Porcentagens de células apoptóticas e necróticas observadas no ensaio de neuroproteção frente ao dano oxidativo induzido pelo H₂O₂ (150 μM), analisados por citometria de fluxo. Análise estatística *Two-Way* Anova com pós-teste de *Dunnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EP.....64

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEI	Inibidor de acetilcolinesterase
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
A β	Beta-amilóide
CAS	Sítio ativo da acetilcolinesterase
ChAT	Colina-O-Acetiltransferase
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP	Erro Padrão
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases</i>
HAM F10	<i>F-10 Nutrient Medium</i>
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
MD	Meio de diferenciação
NGF	<i>Neuronal growth factor</i>
NFT	<i>Neurofibrillary tangle</i>

NMDA	N-metil-D-aspartato
O ₂	Oxigênio
OH ⁻	Hidroxila
O ₂ ⁻	Superóxido
PAS	Sítio periférico da acetilcolinesterase
PBS	Solução tampão fosfato
PC12	Feocromocitoma de rato
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SBF	Soro bovino fetal
SH-SY5Y	Subclone neuroblástico da linhagem de neuroblastoma humano
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Doença de Alzheimer	23
1.2. Estresse oxidativo na DA	26
1.3. Sistema colinérgico na DA	28
1.4. Novos compostos AChEIs para o tratamento da DA.....	29
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo	37
3.2. Diferenciação das células PC12 em neurônios utilizando o NGF	37
3.3. Compostos inibidores da AChE	37
3.4. Indução de danos oxidativos	38
3.5. Ensaio de neurodiferenciação em células tratadas com os compostos AChEIs.....	38
3.6. Análise da neurodiferenciação	38
3.7. Expressão proteica por <i>Western blotting</i>	39
3.7.1. Extração de proteínas.....	39
3.7.2. Eletroforese de proteínas	39
3.7.3. Imunodeteção e expressão proteica	40
3.8. Análise de marcadores neuronais por imunofluorescência	40
3.9. Ensaio de neuroproteção	41
3.10. Ensaio de viabilidade celular.....	42
3.11. Cinética do ciclo celular por citometria de fluxo	42
3.12. Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo.....	43
3.13. Análises estatísticas	43
4. RESULTADOS	46
4.1. Caracterização da diferenciação neuronal das células PC12	46
4.1.1. Análise morfológica da diferenciação das células PC12 em neurônios maduros.....	46

4.1.2. Imunofluorescência de marcadores neuro-específicos nas células PC12 diferenciadas em neurônios.....	46
4.1.3. Análise da diferenciação neuronal e neuritogênese	47
4.1.4. Expressão proteica do marcador neuronal β -III-tubulina	49
4.2. Avaliação da capacidade de indução de neurodiferenciação pelos compostos AChEI nas células PC12.....	50
4.2.1. Análise de neurodiferenciação e alterações morfológicas.....	50
4.2.2. Efeitos quantitativos dos AChEIs quanto à diferenciação neuronal e neuritogênese	52
4.2.3. Detecção de marcadores neuronais em células PC12 tratadas com AChEIs.....	54
4.2.4. Expressão proteica do marcador neuronal β -III-tubulina	56
4.3. Ensaio de neuroproteção frente a danos oxidativos induzidos pelo H ₂ O ₂	57
4.3.1. Curva de ação do H ₂ O ₂	57
4.3.2. Análise da citotoxicidade e capacidade neuroprotetora dos AChEI sob estresse oxidativo em células PC12 diferenciadas	58
4.3.3. Análise da cinética do ciclo celular após ensaio de neuroproteção com os AChEIs.....	61
4.3.4. Avaliação da indução de morte celular pelos compostos AChEIs após ensaio de neuroproteção	63
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

Atualmente, estima-se que 55 milhões de pessoas no mundo possuam alguma forma de demência, com uma probabilidade de dobrar esse número a cada 20 anos (*Alzheimer's Disease International*, 2021). De acordo com a Associação Brasileira de Alzheimer, no Brasil estima-se que mais de 1 milhão de pessoas vivem com demência, sendo que a doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum e compreende cerca de 60 a 80% dos casos, estando mais presente entre pacientes com idade acima de 65 anos. (*Alzheimer's association*, 2021).

A DA é uma enfermidade neurodegenerativa, caracterizada pelo comprometimento de funções cognitivas, memória e comportamento (Atri, 2019). Segundo o *World Alzheimer Report*, 2021, apesar de ser um grande problema de saúde pública em todo o mundo, até o presente, não foram identificados tratamentos capazes de alterar significativamente o curso da doença.

Não sendo considerada uma condição única e independente, mas uma doença complexa, as causas da DA podem estar associadas a fatores genéticos e ambientais (Kandimalla et al., 2017; Motta et al., 2007). Os casos que apresentam herança genética familiar estão comumente associados a mutações no gene da presenilina, presenilina 2 e no gene que codifica a proteína precursora amiloide (APP), os quais são localizados respectivamente nos cromossomos 14, 1 e 21, sendo estes referidos como responsáveis pela forma familiar da DA (Levy-Lahad, et al., 1995; Campion, et al., 1999). Esses casos apresentam herança autossômica dominante e são mais raros, representando menos de 5% de todos os casos (Ashford & Mortimer, 2002). Por outro lado, a forma esporádica da doença, a qual não apresenta uma herança familiar, compreende a maior parte dos pacientes com a DA (Swerdlow, et al., 2014), sendo geralmente associadas à idade e a fatores ambientais, os quais constituem fatores de risco mais importantes (De Falco, et al., 2015). Entre os casos esporádicos, não há uma definição clara sobre quais genes estão envolvidos na etiologia da DA, embora haja consenso quanto à influência do alelo da Apolipoproteína E4 (ApoE4) no desenvolvimento da doença (Saunders, et al., 1993; Blennow, et al., 2006).

Apesar das diferenças nos fatores genéticos envolvidos na sua etiologia, as duas formas, familiar e esporádica, apresentam as mesmas marcas histopatológicas, que são consideradas *hallmarks* da DA (De Falco, et al., 2015). Entre estas, destacam-se a formação de placas amiloides, compostas pelo acúmulo de peptídeos beta-amiloide ($A\beta$) e os emaranhados neurofibrilares (do inglês, *neurofibrillary tangles* NFTs), que ocorrem devido à fosforilação anormal da proteína tau (Masters, et al., 2015). Além destas, outras alterações ocorrem por meio de mecanismos subjacentes descritos na DA, como processos inflamatórios, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Newcombe, et al., 2018; Tönnies & Trushina, 2017). Devido ao grande número de mecanismos envolvidos na etiologia da DA, diversas hipóteses têm sido propostas para compreender a etiologia dessa doença.

A hipótese da cascata amiloide, postulada em 1992, considera a clivagem incorreta da APP, seguida da deposição das placas amilóide e os eventos decorrentes destas, como as principais causas da DA (Hardy, 1992). A APP é uma proteína transmembrana, normalmente clivada pela α -secretase, o que libera fragmentos solúveis da APP, que não são tóxicos para as células (Yuksel & Tacal, 2019). Já em condições patogênicas como na DA, mutações em genes (como os da β e γ -secretase) promovem a clivagem anormal da APP, liberando os peptídeos insolúveis $A\beta$ que se agregam em oligômeros (Arbor, 2016; Li et al., 2018). Os oligômeros $A\beta$, principalmente das formas $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$, se acumulam e difundem para as sinapses, onde alteram proteínas e sua sinalização, levando à disfunção sináptica (Selkoe e Hardy, 2016; Gylys, 2004). Os oligômeros de $A\beta$ também já foram associados ao aumento da hiperfosforilação da proteína tau e do estresse oxidativo, bem como à disfunção mitocondrial e alteração na neuritogênese em células progenitoras neurais (NPCs) (Bassil et al., 2020; Bhatia & Sharma, 2021; Butterfield & Boyd-Kimball, 2004; Haughey et al., 2002). Apesar disso, outros autores acreditam que a deposição da $A\beta$ não é o fator inicial no desenvolvimento da DA (Ricciarelli & Fedele, 2017; Spires-Jones & Hyman, 2014; Nelson, et al., 2012).

Outra importante hipótese para a DA é a da proteína tau; em condições normais esta proteína se liga aos microtúbulos promovendo a sua estabilização (Ballatore et al., 2007). Na DA ocorre a hiperfosforilação dessa proteína, o que promove a sua auto-agregação, sendo que a associação de diversas proteínas tau hiperfosforiladas leva à formação de filamentos helicoidais pareados e filamentos alinhados, que se agregam e formam NFTs intracelulares, impedindo a sua ligação aos microtúbulos

(Chu & Liu, 2019; Verwilt et al., 2018; Shentu et al., 2018). Desta forma, ocorre a desestabilização dos microtúbulos, levando à sua desagregação. Esse mecanismo causa o comprometimento do transporte axonal, perda de função sináptica, disfunção mitocondrial e do citoesqueleto, além de estresse oxidativo (Blennow, et al., 2006; Gao, et al., 2018).

Por outro lado, a hipótese colinérgica relaciona alterações no sistema colinérgico como o principal fator que desencadeia o desenvolvimento da DA (Hampel, et al., 2019). O sistema colinérgico é constituído pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), seus receptores e pelas enzimas envolvidas no processo de síntese, a qual ocorre por meio da ação da Colina-O-acetil-Transferase (ChAT), e degradação da ACh, que acontece devido à hidrólise por meio da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Ventura, et al., 2010; Anand, et al., 2013). Os neurônios colinérgicos, que são regulados pela ACh, estão amplamente distribuídos no cérebro e são essenciais para a modulação de funções cognitivas, como memória, aprendizado, resposta ao estresse e atenção (George & Grossberg, 2003). Em condições fisiológicas normais, os processos de síntese, liberação e degradação da ACh são altamente regulados nas fendas sinápticas, para que haja um nível de estímulo equilibrado entre os neurônios colinérgicos (Ferreira-Vieira, et al., 2016). Entretanto, no cérebro de pacientes com a DA, alterações como diminuição dos níveis de ChAT e ACh na região do córtex cerebral, além do aumento na disponibilidade da AChE, foram observadas (Stanciu et al., 2019). Tais alterações contribuem para a perda de neurônios colinérgicos e consequente atrofia cerebral, fornecendo evidências para a elaboração da hipótese colinérgica (Hampel et al., 2019). Bartus e colaboradores (1982) formularam tal hipótese, que identifica disfunções no sistema colinérgico como um fator crucial para o desenvolvimento de distúrbios cerebrais associados ao envelhecimento normal, bem como no caso da DA.

Outra hipótese considerada relevante para o estudo da DA é a da cascata mitocondrial, que está associada principalmente ao quadro de estresse oxidativo crônico estabelecido nos estágios iniciais da doença (Wang et al., 2014). Nos neurônios, as mitocôndrias são a principal fonte produtora de ATP e espécies reativas de oxigênio (do Inglês *Reactive Oxygen Species* – ROS), as quais são produzidas como subprodutos do metabolismo celular, participando da regulação dos mecanismos de sinalização e da expressão gênica (Ionescu-Tucker & Cotman, 2021; Bisht & Dada, 2017). Devido ao papel central das mitocôndrias no metabolismo

celular, a disfunção mitocondrial, condição em que a integridade mitocondrial é afetada, gerando alterações na produção de ATP e o aumento na produção de ROS, pode iniciar e influenciar múltiplas patologias vistas na DA, como processamento incorreto da APP, acúmulo de peptídeos A β , formação de NFTs, aumento de danos no DNA e estresse oxidativo (Johnson et al., 2021; Swerdlow, et al., 2014). Da mesma forma como a disfunção mitocondrial aumenta os níveis de estresse oxidativo, esta condição contribui para a disfunção mitocondrial, estabelecendo um complexo ciclo vicioso que é observado na DA (Grimm & Eckert, 2017). Devido aos diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DA, apesar do grande número de estudos nas últimas décadas que buscam compreender a etiologia dessa doença, ainda permanecem desafios na sua compreensão e muitos aspectos da doença necessitam ser elucidados (Leandro et al., 2018).

1.2. Estresse oxidativo na DA

A molécula de DNA é altamente susceptível a modificações químicas por agentes endógenos e exógenos (Chatterjee & Walker, 2017). Tais modificações consistem em danos ou lesões, que sendo acumulados ao longo do tempo podem comprometer o metabolismo do DNA, levando à perda da funcionalidade celular e degeneração de células e tecidos (Ribezzo et al., 2015). Além disso, danos ou deficiências nos sistemas de reparo do DNA, os quais tentam corrigir essas lesões, são especialmente perigosos pelo fato de comprometerem a integridade celular (Kwiatkowski, 2016).

Entre os agentes endógenos que podem causar lesões na molécula do DNA estão as ROS, sendo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($OH^{\cdot-}$) as principais formas encontradas (Tönnies & Trushina, 2017). As ROS são constantemente produzidas, principalmente pelas mitocôndrias, nas quais elétrons escapam da cadeia transportadora durante o processo de respiração celular e se combinam com oxigênio (Pizzino et al., 2017). Em concentrações moderadas, ROS são essenciais para o funcionamento do metabolismo, pois participam da regulação dos mecanismos de sinalização e da expressão gênica, porém, em alta concentração, podem causar impactos negativos nos processos biológicos (Chatterjee & Walker, 2017; Berra et al., 2006).

Para controlar os níveis de ROS, o mecanismo natural de defesa do organismo é o sistema antioxidante, formado principalmente por enzimas antioxidantes como as SOD (que catalisam $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2), e as glutathionas peroxidases e catalases, que reduzem as moléculas de H_2O_2 em H_2O , porém, quando há um desbalanço do sistema antioxidante, as moléculas de H_2O_2 são capazes de reagir com íons metálicos formando OH^- , a forma mais reativa de ROS, a qual não é controlada pelo sistema antioxidante (Poprac et al., 2017; Brieger et al., 2012). Quando os níveis de produção de ROS ultrapassam o limite de ação do sistema celular antioxidante torna-se estabelecido um estado definido como estresse oxidativo (Bisht e Dada., 2017).

Na situação de estresse oxidativo, as ROS podem causar alterações funcionais por meio de danos oxidativos aos lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (RNA e DNA). A molécula de DNA sofre danos e modificações oxidativas constantemente, resultando na oxidação de bases nitrogenadas (Brieger, et al., 2012; Haq, et al., 2019). Os danos oxidativos também podem levar à formação de quebras simples e duplas nas cadeias do DNA; essas modificações, quando não recuperadas pelo sistema de reparo, podem causar mutações e até morte celular (Berra et al., 2006).

O DNA mitocondrial (mtDNA) também é susceptível aos efeitos do estresse oxidativo, sendo que a elevada concentração de ROS intracelular (principalmente $O_2^{\cdot-}$ e OH^-) pode causar danos irreversíveis ao mtDNA, acarretando disfunção mitocondrial (Anderson et al., 2020). Esse processo ocorre em consequência do aumento na produção de ROS devido a modificações na cadeia transportadora de elétrons, causando deficiências na produção de ATP e, conseqüentemente, um déficit energético, bem como alteração na produção de moléculas essenciais (como nucleotídeos) e sinalização mitocondrial anormal (Islam, 2017; Sorrentino et al., 2018).

O acúmulo de lesões no DNA causado pelo estresse oxidativo contribui para a progressão do processo neurodegenerativo, principalmente quanto a alterações nos mecanismos de reparo do DNA e na regulação do ciclo celular, já observadas em pacientes com a DA (Leandro et al., 2013; Weissman et al., 2007). Nesse sentido, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são considerados processos fundamentais na DA; alguns autores consideram a disfunção mitocondrial como fator inicial da DA, pois associada aos efeitos do envelhecimento, afeta o processamento da APP, levando à acumulação da $A\beta$ e, conseqüentemente, o desenvolvimento da

DA, fundamentando a hipótese da cascata mitocondrial (Tönnies & Trushina, 2017; Swerdlow et al., 2014; Tobore 2019).

Ainda, é importante ressaltar que as alterações histopatológicas comumente observadas no tecido cerebral de pacientes com DA também podem ser associadas com o estabelecimento de um quadro crônico de estresse oxidativo na DA. Estudos já demonstraram que peptídeos A β têm a capacidade de induzir danos oxidativos e quebras de fita no DNA, bem como a hiperfosforilação da tau, inflamação e disfunção mitocondrial, que são associados à indução de estresse oxidativo (Wu et al., 2014; Chen & Zhong, 2014). Nesse sentido, estudos *in vitro* voltados para a identificação de compostos capazes de proteger células neuronais contra os efeitos danosos do estresse oxidativo têm sido realizados, pois devido ao papel central do estresse oxidativo no desenvolvimento da DA, este pode ser considerado um tema relevante para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento da DA (Camps et al., 2010; Estrada et al., 2016; Chierrito et al., 2017).

1.3. Sistema colinérgico na DA

A partir da hipótese colinérgica, a AChE passou a ser considerada um importante alvo terapêutico para tratar os sintomas da DA, havendo um esforço no desenvolvimento de compostos capazes de inibir a sua ação e aumentar os níveis de ACh disponíveis (Stanciu et al., 2019; McGeer & McGeer 2003). A AChE é altamente seletiva para a ACh e possui atividade catalítica mesmo em baixas concentrações da ACh; sua ligação se dá por meio de duas regiões da AChE, o sítio ativo (CAS) e um sítio aniônico periférico (PAS) (Lane et al., 2004; Wiesner et al., 2007). Além dos efeitos no sistema colinérgico, a AChE também foi associada ao acúmulo de peptídeos A β nos tecidos cerebrais, outro fator envolvido na etiopatologia da DA, visto que esses peptídeos têm a capacidade de se ligarem ao sítio PAS da AChE, promovendo a sua agregação (De Ferrari et al., 2001; Rees et al., 2003). Com base no conjunto dessas informações, foram desenvolvidos os inibidores da AChE (AChEIs) como uma alternativa para o tratamento da DA.

O tratamento dos pacientes com AChEIs visa proteger os tecidos cerebrais e desacelerar o processo de declínio cognitivo, por meio do aumento da neurotransmissão colinérgica (Vesey et al., 2002). Os AChEIs atuam na redução da atividade da AChE, gerando um aumento na disponibilidade de ACh, pois inibem a

sua degradação; além disso, os AChEIs também exibem efeitos considerados não-colinérgicos, como a redução no número de agregados A β (George & Grossberg, 2003; Camps et al., 2008). A tacrina foi o primeiro fármaco da classe dos AChEIs a ser amplamente utilizado no tratamento da DA, apresentando eficiência na desaceleração dos sintomas da DA (Qizilbash et al., 1998; Shao et al., 2004), porém o seu uso a longo prazo apresentou efeitos colaterais para os pacientes, principalmente hepatotoxicidade, resultando na suspensão do tratamento com esse medicamento (Watkins et al., 1994; Sereniki e Vital, 2008).

O tratamento da DA com AChEIs já demonstrou modestas melhorias nos sintomas de pacientes em estágios classificados como leve a moderado (Howard et al., 2020). Atualmente, apenas quatro fármacos têm sido administrados em pacientes sintomáticos com a DA; entres eles, a memantina é o único antagonista não competitivo dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), já os outros três são da classe dos AChEIs: rivastigmina, galantamina e donepezila; estas diferem apenas na sua farmacocinética e formulação, mas não apresentam grandes diferenças quanto à sua eficácia, que é modesta e indicados para os estágios inicial e médio da DA, não sendo eficazes em longo prazo (McShane et al., 2020; Long & Holtzman, 2019). Um fator associado ao uso dos AChEIs se relaciona aos possíveis efeitos colaterais para alguns pacientes, que atingem principalmente o sistema gastrointestinal, causando episódios de náusea e vômito (George & Grossberg, 2003).

1.4. Novos compostos AChEIs para o tratamento da DA

Devido à eficácia limitada dos fármacos atualmente disponíveis para DA, a busca por novos compostos visando reduzir os efeitos colaterais e aumentar a eficiência dos tratamentos atuais se mostra necessária. Pesquisas com compostos híbridos, que foram sintetizados a partir de AChEIs já em uso como fármacos, buscam potencializar a inibição da AChE por meio da ligação simultânea aos sítios CAS e PAS (Chieritto et al., 2017); segundo relatos da literatura, além da redução nos níveis de ACh, a dupla ligação a dois sítios da AChE proporciona a redução da agregação dos peptídeos A β (Camps et al., 2008; Piazzini et al., 2003).

A capacidade de induzir a diferenciação neuronal também é uma característica importante na busca por novos compostos, visto que a homeostase relativa aos níveis de neurodiferenciação no cérebro é uma condição importante para a manutenção das

funções fisiológicas normais no cérebro (More et al. 2012). A produção de novos neurônios a partir das NPCs em cérebro de adultos ocorre principalmente na região do hipocampo e no bulbo olfatório (Eriksson et al., 1998; Gould, 2007; Pi-Chan et al., 2020). Em condições patológicas, como na DA, os oligômeros de A β e a redução na disponibilidade de ACh comprometem a neurogênese, o que contribui ainda mais para perda de neurônios (Haughey et al., 2002). Nesse contexto, estratégias capazes de compensar a redução no número de neurônios, por meio da indução da diferenciação neuronal são consideradas relevantes (Kaneko & Sawamoto, 2009). Estudos com donepezila demonstraram que a inibição da AChE é capaz de induzir a diferenciação de neurônios e oligodendrócitos em modelos humanos *in vivo* e *in vitro* (Imamura et al., 2020; Kaneko et al., 2006), demonstrando que essa estratégia possui potencial para atuar em mais um alvo terapêutico para a DA.

Diante disso, o grupo de pesquisa do Laboratório de Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Ivone carvalho, sintetizou novos compostos híbridos a partir dos AChEIs tacrina e donepezila (**Figura 1**). O objetivo foi a obtenção de compostos capazes de diminuir a toxicidade atribuída ao núcleo acridina da tacrina, mantendo a capacidade de ligação ao sítio CAS da AChE, além de conferir a capacidade de ligação ao sítio PAS da mesma enzima, criando então compostos com capacidade de dupla ligação (Chierrito et al., 2017).

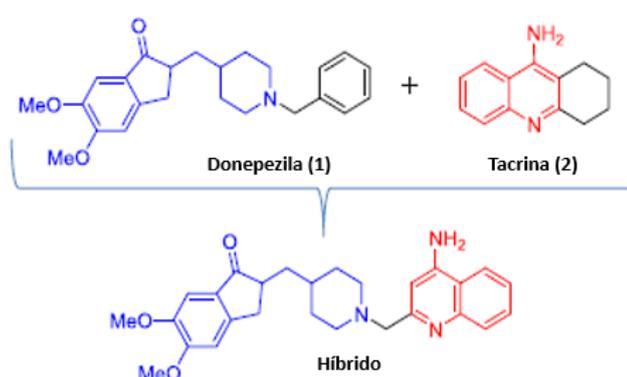


Figura 1: Estratégia de hibridização aplicada à síntese de novos compostos híbridos inibidores de acetilcolinesterase (AChEIs) a partir da donepezila e tacrina (dados extraídos de Chierrito, et al., 2017).

Foram desenvolvidos então dois compostos (TA8Amino e TAHB3) que demonstraram eficiência superior aos compostos originais com relação à inibição da AChE (Chierrito et al., 2017; Moreira et al., 2020) (**Figura 2**). Estes foram testados em ensaios biológicos, realizados em colaboração com pesquisadores do presente laboratório (Citogenética e Mutagênese, FFCLRP e FMRP-USP), usando linhagens celulares SH-SY5Y (Neuroblastoma Humano) e HepG2 (Carcinoma hepatocelular humano). Foram analisados parâmetros como neurodiferenciação, citotoxicidade, viabilidade e morte celular, bem como a capacidade de neuroproteção frente a danos induzidos por H₂O₂ e peptídeo A β .

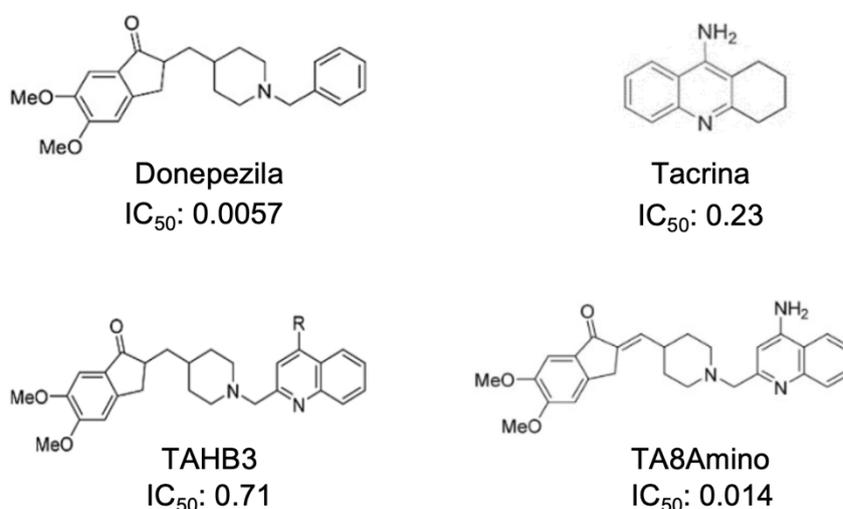


Figura 2: Representação das estruturas moleculares dos compostos AChEIs com seus respectivos valores de 50% da ação inibitória máxima (IC₅₀). Compostos originais donepezila e tacrina e os novos compostos híbridos TAHB3 e TA8Amino (dados extraídos de Chierrito, et al., 2017).

Os resultados já obtidos demonstraram que, por meio da ativação da via PI3K/Akt (do inglês, *phosphoinositide 3-kinase* e *Protein Kinase B*), os compostos estimularam a neurodiferenciação e neuritogênese nas células SH-SY5Y; os compostos também demonstraram baixos níveis de citotoxicidade e não induziram alterações na viabilidade celular nas concentrações próximas ao IC₅₀ de inibição da AChE. Também foi observado um efeito neuroprotetor em resposta a danos induzidos pelo peptídeo A β (Moreira, 2019; Moreira et al., 2020). Esses dados preliminares demonstram o potencial terapêutico dos compostos TA8Amino e TAHB3 para DA, e ressaltam a importância da continuação de estudos com essas moléculas em

diferentes modelos e linhagens celulares para comprovar a capacidade indutora de diferenciação e de efeitos neuroprotetores

1.5. Linhagem celular PC12 como modelo de estudo para DA

A linhagem celular PC12 foi estabelecida por Greener e Tischlert em 1976, obtida a partir de tumores na medula adrenal de ratos, denominados feocromocitomas. Em seu estado não diferenciado, as células PC12 tendem a crescer em pequenos grumos e apresentam formato arredondado ou poligonal (Greene & Tischlert, 1976). Estas podem ser diferenciadas em neurônios, pois são sensíveis à ação do *Neuronal Growth Factor* (NGF), após as primeiras 24 h de exposição a este reagente, tempo suficiente para as células apresentarem alterações morfológicas, como crescimento de neuritos (Greene & Tischlert, 1976).

A neurodiferenciação induzida pelo NGF nas células PC12 é ativada por meio de receptores da tirosina-quinase, seguido da ativação da ERK (Do inglês, *Extracellular signal-regulated protein kinases*), que induz a formação de neuritos (Vaudry et al., 2002). O NGF também é capaz de ativar a via da PI3K/Akt, que está envolvida nos processos de neurodiferenciação e sobrevivência celular (Liu et al., 2017; Song et al., 2018). No entanto, o processo de diferenciação neuronal é reversível, pois com a retirada do NGF do meio de cultura, as células retornam ao seu estado indiferenciado (Greene & Tischlert, 1976).

Após a diferenciação as células PC12 passam a apresentar comportamento similar a neurônios maduros, como excitabilidade elétrica, liberação dos neurotransmissores dopamina, neuroadrenalina e acetilcolina e expressão de marcadores proteicos neuronais como β -III-tubulina, MAP2 e Tau-1 (Ohnuma et al., 2005; Popova, et al., 2017; Shen et al., 2012). Além dessas características, as células PC12 neurodiferenciadas são adequadas para o estudo do sistema colinérgico, visto que possuem as enzimas ChAT e AChE e receptores nicotínicos e muscarínicos da ACh, sendo capazes de sintetizar, armazenar e liberar o neurotransmissor acetilcolina (Greene & Rein, 1977). Por possuir essas características, a linhagem PC12 é considerada como um modelo neuronal *in vitro* já estabelecido, amplamente utilizado no estudo de doenças neurodegenerativas e na avaliação das propriedades neurotóxicas e neuroprotetoras de substâncias (Tian et al., 2019; Liu et al., 2021; Wiatrak et al., 2020). Zeng e colaboradores (2017) utilizaram as células PC12

diferenciadas como modelo neuronal para testar as propriedades neuroprotetoras da artemisina, frente a danos induzidos pelo peptídeo A β . Em outra pesquisa realizada por Ferreira e colaboradores (2017), os autores analisaram os efeitos do ester fenetil do ácido caféico quanto a efeitos de neuroproteção e neurodiferenciação nas células PC12. Tais exemplos demonstram que as células PC12 são realmente um modelo neuronal adequado para a aplicação no presente estudo.

Levando em consideração os dados da literatura em adição aos do presente laboratório, com relação à eficiência dos AChEIs na redução do estresse oxidativo e proteção contra morte celular em modelos neuronais *in vitro*, no presente projeto, foi formulada a hipótese de que os compostos sintéticos híbridos donepezila-tacrina, TA8Amino e TAHB3, exibirão capacidade indutora de neurodiferenciação nas células PC12, bem como atividade neuroprotetora contra danos induzidos por estresse oxidativo em neurônios maduros diferenciados a partir da linhagem celular PC12. Os resultados obtidos poderão fornecer informações relevantes quanto aos efeitos dos compostos híbridos, sintetizados a partir dos AChEIs, os quais são utilizados como fármacos para o tratamento da DA. Com as previsões do aumento anual de novos casos de DA, somado à falta de tratamentos eficazes para impedir a progressão dessa doença, o estudo de novas moléculas com capacidade neuroprotetora e indutoras de neurodiferenciação se mostra uma estratégia importante e promissora na busca de novos candidatos a fármacos para a terapia da DA.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo analisar a citotoxicidade, a capacidade indutora de neurodiferenciação e os efeitos de neuroproteção dos compostos híbridos donepezila-tacrina (TA8Amino e TAHB3), inibidores da AChE, na linhagem celular PC12 diferenciada em neurônios maduros, em resposta a danos induzidos por estresse oxidativo.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar a diferenciação neuronal das células PC12 induzida pelo NGF.
2. Avaliar a capacidade de os compostos híbridos (TAHB3 e TA8Amino) de induzir a neurodiferenciação e o crescimento de neuritos nas células PC12 indiferenciadas.
3. Avaliar a citotoxicidade dos compostos híbridos TA8Amino e TAHB3 nas células PC12 diferenciadas em neurônios.
4. Estudar a capacidade neuroprotetora dos compostos híbridos frente ao dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio nas células PC12 diferenciadas em neurônios.
5. Analisar o efeito dos compostos híbridos com relação à cinética do ciclo celular nas células PC12 diferenciadas em neurônios, frente à indução de danos oxidativos.
6. Avaliar as taxas de morte celular por apoptose e necrose nos neurônios diferenciados a partir das células PC12 tratados com os compostos TA8Amino e TAHB3 e com o indutor de dano oxidativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Para os ensaios celulares foi utilizada a linhagem celular PC12 (Feocromocitoma de rato) adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC). As células foram cultivadas em frascos de cultivo (25 cm²) com meio de cultura completo, constituído de DMEM + HAM F10 (DMEM/F10) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% de solução de penicilina (100 unidades/mL) e 1% de estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em proliferação até atingirem o estado de semi-confluência (~5x10⁶ células). Para a realização dos experimentos com os compostos, as células foram despregadas dos frascos com solução tripsina-EDTA (0,05%) e subcultivadas em placas de 6, 12 ou 24 poços e incubadas a 37°C e 5% CO₂ para a realização dos protocolos de tratamento. Inicialmente todas as linhagens foram avaliadas quanto à possibilidade de contaminação por micoplasma, usando o corante Hoechst 33342 (*Sigma-Aldrich*) para análise em microscópio de fluorescência (*Zeiss, Axioplan 2*). Foram utilizadas apenas linhagens livres de micoplasma para a execução dos experimentos do presente projeto.

3.2. Diferenciação das células PC12 em neurônios utilizando o NGF

A diferenciação das células PC12 em neurônios maduros utilizando NGF (*Nerve Growth Factor- Thermo Fisher Scientific*) foi realizada de acordo com o protocolo de Greener e Tischler (1986) com adaptações. As células foram cultivadas em placas de cultura e mantidas em meio de cultura completo, DMEM/F10 contendo 10% de SBF e 50 ng/mL de NGF durante 7 dias. O meio de cultivo com NGF foi trocado a cada 48 h para realização da manutenção celular.

3.3. Compostos inibidores da AChE

Os compostos inibidores da AChE foram fornecidos pelo Laboratório de Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Ivone Carvalho. Os compostos híbridos donepezil-tacrina são denominados TA8Amino e TAHB3 (inibidores da AChE). As soluções

foram diluídas inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois passaram por uma segunda diluição em solução tampão fosfato (PBS). Posteriormente, no tratamento das células, foram utilizadas as concentrações baseadas nos valores de 50% de inibição da AChE (IC_{50}) para TA8Amino e TAHB3, com base nas curvas de dose-resposta previamente obtidas em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, sendo 5 μ M para os compostos híbridos; já para donepezila e tacrina, foi utilizada a concentração de 10 μ M, com base na literatura (Rafiepour, et al., 2019; Svensson & Nordberg, 1998).

3.4. Indução de danos oxidativos

O composto utilizado para a indução de danos oxidativos foi o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – Sigma-Aldrich). Para encontrar a condição danos que reduzissem a viabilidade celular em aproximadamente 50%, as concentrações de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 μ M de H_2O_2 foram testadas, sendo escolhida a concentração de 150 μ M.

3.5. Ensaio de neurodiferenciação em células tratadas com os compostos AChEIs

Para analisar a capacidade de os compostos AChEIs na indução de diferenciação neuronal, as células PC12 foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^5 células/poço) e mantidas em 2 mL de meio de cultura completo com adição dos AChEIs isoladamente na concentração de 5 μ M para os compostos híbridos e 10 μ M para donepezila e tacrina. Para esse ensaio utilizou-se o mesmo protocolo de diferenciação estabelecido para o NGF (50 ng/mL), ou seja, o meio de cultura com os AChEIs foi trocado a cada 48 h para manter os tratamentos. O NGF foi utilizado como controle positivo para diferenciação e as células PC12 indiferenciadas, como controle negativo. Após 7 dias de tratamento, diferentes análises foram realizadas para avaliar a neurodiferenciação, conforme descrito a seguir.

3.6. Análise da neurodiferenciação

Para comprovar a neurodiferenciação após o protocolo de 7 dias de tratamento, as células foram analisadas em microscópio invertido (*EVOS XL Core- Invitrogen*); foram capturadas 20 imagens para cada tratamento em ampliação de 40x. Para avaliação e quantificação da diferenciação neuronal foi utilizado o protocolo de Liu et

al., 2005; para medir o comprimento dos neuritos utilizou-se a ferramenta *Simple Neurite Tracer* do software *ImageJ (Fiji)*. Foram medidos 100 neuritos por tratamento, sendo um por célula, cada um sendo medido desde a base no corpo celular até a extremidade. Para contabilizar a porcentagem de células diferenciadas, foram contadas 100 células por tratamento, sendo consideradas como células diferenciadas, aquelas que possuíam pelo menos um neurito maior que o diâmetro da célula; as medidas também foram realizadas utilizando a ferramenta *Simple Neurite Tracer* do software *ImageJ (Fiji)*.

3.7. Expressão proteica por *Western blotting*

3.7.1. Extração de proteínas

Para a extração de proteínas após a realização do ensaio de neurodiferenciação, utilizou-se o reagente *RIPA Lysis and extraction buffer (Thermo Fisher Scientific)* de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, as células foram desprendidas da superfície dos poços com tripsina e centrifugadas a 112g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuscitado em PBS. Em seguida, seguiu-se uma nova centrifugação e, sendo removido o sobrenadante e o *pellet* contendo as células foi ressuscitado em solução de RIPA Buffer com 1 % de inibidores de proteases *Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Fisher Scientific)*; após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4°C em 112g durante 15 min. A seguir, o sobrenadante foi separado e armazenado em microtubos para centrifuga a -80°C. A quantificação proteica foi realizada em espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão obtida para uma proteína conhecida (soro albumina bovina) utilizando-se o kit *BCA (Pierce)*.

3.7.2. Eletroforese de proteínas

Para a realização da eletroforese de proteínas foi utilizado o gel *NuPage Bis-Tris Gels (Invitrogen)*. Após a quantificação, as amostras foram preparadas com 20 µg de proteínas que foram desnaturadas a 90°C por 5 min. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)*. A eletroforese foi realizada a 100V por 1,5 h em cuba (*XCell*

SureLock Mini Cell-Invitrogen. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (*Invitrolon PVDF- Invitrogen*), utilizando o sistema *XCell II Blot Mobile (Invitrogen)*. A voltagem utilizada foi estabelecida de acordo com o recomendado pelo fabricante, sendo 25 V durante 2 h. Após esse tempo, as membranas foram armazenadas em água *MilliQ* (ultrapura) a 4°C, até proceder a imunomarcação.

3.7.3. Imunodeteção e expressão proteica

Para a imunodeteção e visualização das proteínas foi utilizado o kit *Western Breeze Chromogenic (Invitrogen)*. Inicialmente, foi realizado o bloqueio da membrana com solução de bloqueio e incubada por 60 min em um agitador rotatório. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com água *MilliQ* (ultrapura) durante 5 min e incubada com 4mL do anticorpo primário por 12 h. Logo após, foram realizadas 4 lavagens de 5 min com solução *Wash Solution (Invitrogen)* e retirado o excesso da solução com duas lavagens de água *MilliQ* (ultrapura). Dando sequência, a membrana foi então incubada com 4 mL de solução de anticorpo secundário anti-rabbit (*Invitrogen*) por 30 min, sendo em seguida, novamente lavada quatro vezes com solução de lavagem e em seguida retirado o excesso com duas lavagens com água *MilliQ* (ultrapura). Os anticorpos utilizados foram: *Anti-rabbit β -III-tubulina (Cell Signaling Technology)*, além do endógeno *anti-rabbit β -Actina (Cell Signaling Technology)*, utilizado como controle para normalização. As membranas foram escaneadas em fotodocumentador (*ImageQuant LAS 500, GE*), sendo as bandas quantificadas no programa *Image Studio (LI-COR)*; os valores de expressão das proteínas foram normalizados em relação à proteína endógena.

3.8. Análise de marcadores neuronais por imunofluorescência

Para a análise de diferenciação celular, as células PC12 foram cultivadas em lamínulas, utilizando placa de 6 poços. O meio de cultura com os compostos indutores de diferenciação foi trocado a cada dois dias, para manter os tratamentos, até que se completem 7 dias. Para proceder a análise por imunofluorescência, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol durante 20 min à temperatura ambiente, permeabilizadas com PBS/Tween 0,2% e bloqueadas com solução de

BSA (1%). As células foram incubadas durante 12 h a 4°C com os anticorpos primários *Anti-rabbit* β -III-tubulina (*Cell Signaling Technology*) (1:500), *Anti-rabbit* MAP2 (*Cell Signaling Technology*) (1:500), *anti-rabbit* nestin (*Abcam*) (1:500), em seguida, foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário *Alexa flúor 488 goat* (*Invitrogen*). Em seguida, as células foram coradas com Hoechst 33342 (0,5 μ g/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência.

3.9. Ensaios de neuroproteção

Para os ensaios de neuroproteção, as células PC12 foram semeadas em placas de 24 poços (3×10^4) e submetidas ao protocolo de diferenciação durante 7 dias com NGF (50 ng/mL). Após a obtenção de neurônios maduros, foram adicionados os compostos AChEIs por 48 h. Em seguida, adicionou-se o H_2O_2 durante 2 h para indução de danos ao DNA. Após os tratamentos, o meio foi removido, sendo adicionado um novo meio completo DMEM/F10 com 10% SFB, contendo NGF (50 ng/mL), no qual as células foram mantidas por 24 h para recuperação e análises subsequentes (**Figura 3**).

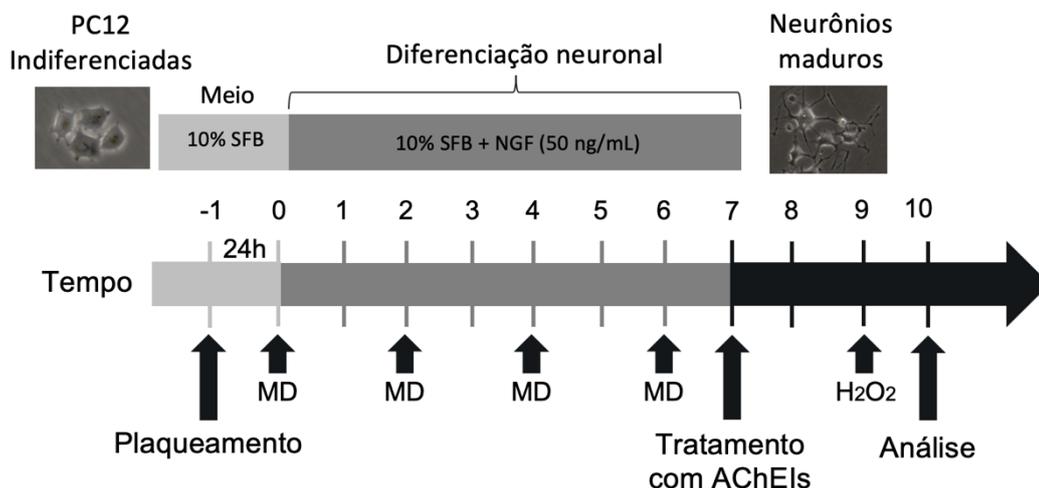


Figura 3: Protocolo para ensaios de neuroproteção. Após a diferenciação das células PC12 em neurônios maduros, estas foram pré-tratadas com os compostos AChEIs, seguindo o tratamento com o H_2O_2 para a indução de danos no DNA. Após 24 h de recuperação, as análises de viabilidade celular, cinética do ciclo e indução de morte celular foram realizadas. MD (Meio de diferenciação) contendo meio de cultura completo DMEM/F10 + 10% SFB + NGF 50 ng/mL.

3.10. Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o *kit-XTT (Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular Biochemicals)*, que possibilita a detecção de células viáveis com base no princípio de que as células metabolicamente ativas devem clivar o sal amarelo tetrazolium XTT formando o corante formazam (cor alaranjada). As células PC12 foram semeadas em placas de 24 poços com 3×10^4 células por poço e tratadas com o NGF para diferenciação em neurônios. Em seguida, seguiu-se o protocolo de neuroproteção descrito no item 3.9. ao final das etapas, as células foram incubadas com a solução XTT, permanecendo assim até que ocorresse a mudança de coloração para alaranjado, quando foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A absorbância foi medida em 492 e 690 nm (*aparelho Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek*), obtendo-se resultado diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra.

3.11. Cinética do ciclo celular por citometria de fluxo

Para a análise da cinética do ciclo celular, as células foram semeadas (3×10^4 células/poço) em placas de 24 poços e tratadas segundo o protocolo do item 3.9. No dia da coleta, o meio de cultura foi transferido para microtubos de centrifuga; as células aderidas foram tripsinizadas e transferidas para seus respectivos microtubos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 112 *g* por 5 min, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuscitado em PBS, sendo este processo repetido. Por fim, as células foram fixadas em etanol 70% gelado e mantidas a -20°C até o momento da leitura em citometria de fluxo. Para a leitura, as amostras foram suspensas em 200 μL da solução de iodeto de propídio, composta por PBS 1X, iodeto de propídio (3 mg/mL), Ribonuclease A (10 mg/mL) e Triton X-100 (0.2%), sendo incubadas por 30 min à temperatura ambiente e analisadas em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System*, utilizando o *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment (Guava Technologies)*; pelo menos 5.000 células foram analisadas para cada amostra. Os valores foram expressos em porcentagens de células distribuídas em cada fase do ciclo celular e fração sub-G1.

3.12. Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo

Para análise de morte celular foi utilizado o *kit eBioscience Annexin V Apoptosis* (Invitrogen), que utiliza a anexina-V para detectar os resíduos de fosfatidilserina externalizados na membrana das células apoptóticas; utilizou-se também o corante 7-AAD, o qual identifica células necróticas. As células foram semeadas em placas de 12 poços (3×10^4 células/poço) e o tratamento foi realizado de acordo com protocolo anteriormente descrito no ensaio de neuroproteção (item 3.9). As células foram coletadas e centrifugadas a 112 g por 5 min, sendo o sobrenadante descartado e adicionado em seguida o *binding buffer*; as células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado, sendo as amostras incubadas por 15 min à temperatura ambiente, em solução contendo com 100 μ L de *binding buffer* com 5 μ L de anexina V. Após essa etapa, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em solução de 100 μ L de *binding buffer* com 5 μ L de 7-AAD. As amostras foram então avaliadas por meio de citometria de fluxo, no equipamento *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*), sendo as células analisadas pelo *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*), sendo contados 5000 eventos por amostra. As células em apoptose exibiam marcação com a Anexina V e as que sofreram necrose foram marcadas com 7-AAD, enquanto que as células viáveis não exibiram marcação para os corantes utilizados. Os valores foram expressos em porcentagens de acordo com a marcação pelos corantes.

3.13. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média e erro padrão (\pm EP). Para análises dos resultados da neurodiferenciação entre o grupo tratado com NGF e o controle negativo foi empregado o teste-*t*. Para as análises de neurodiferenciação comparando os quatro diferentes compostos AChEIs, bem como para as análises de neuroproteção em que foi analisada apenas uma variável entre os grupos analisados, como viabilidade celular e cinética do ciclo celular, utilizou-se o teste *One Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Para a análises de indução de morte celular em que foram

analisadas duas variáveis (morte por apoptose e necrose) entre os diferentes grupos de tratamento, foi empregado o teste *Two Way* com pós-teste de *Dunnet*. Em todos os ensaios, o valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo. As análises estatísticas e os gráficos foram construídos usando o programa Prism v. 5.0 (*GraphPad software*).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da diferenciação neuronal das células PC12

4.1.1. Análise morfológica da diferenciação das células PC12 em neurônios maduros

A diferenciação neuronal foi realizada utilizando o indutor de diferenciação neuronal NGF (50 ng/ mL) durante o período de 7 dias. Observou-se que após o tratamento com NGF as células passaram a apresentar alterações morfológicas, como crescimento de neuritos, redução do citoplasma e diminuição do número de células em divisão, o que não foi observado no controle negativo (células PC12 indiferenciadas) (**Figura 4A e 4B**). Tais alterações são específicas de neurônios maduros e demonstram o potencial indutor de neurodiferenciação do NGF em células PC12.

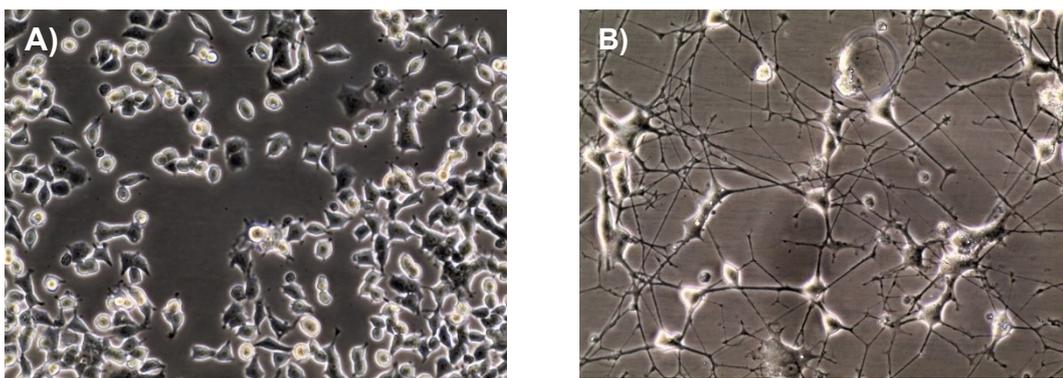


Figura 4: Neurodiferenciação das células PC12 submetidas a 7 dias de tratamento em meio DMEM/F10 + 10% SBF, (A) sem ou (B) com NGF (50 ng/mL). As alterações morfológicas associadas à neurodiferenciação foram observadas em microscópio invertido (*EVOS XL Core- Invitrogen*), sob ampliação de 40x.

4.1.2. Imunofluorescência de marcadores neuro-específicos nas células PC12 diferenciadas em neurônios

Após a observação das alterações morfológicas neuronais induzidas nas células PC12 pela ação do NGF, foi realizada a marcação de proteínas específicas de neurônios, com o objetivo de comprovar a diferenciação destes. Assim, utilizou-se o ensaio de imunofluorescência, no qual as células PC12 indiferenciadas foram marcadas com o anticorpo anti-Nestin, o qual é utilizado para a detecção da proteína nestina (**Figura 5A**). Essa proteína é expressada nas células do sistema nervoso central durante seu estágio embrionário e à medida que a diferenciação neuronal avança, a sua expressão torna-se reduzida, sendo amplamente utilizada como um

marcador de células progenitoras neuronais. As células PC12 diferenciadas foram também marcadas com anticorpos anti- β -III-tubulina e anti-MAP2, que são proteínas específicas de neurônios, presentes no citoplasma e axônios neuronais. Assim, foi detectado que as células após 7 dias de tratamento com NGF se mostraram positivas para marcação por β -III-tubulina e MAP2, demonstrando a diferenciação das células PC12 em neurônios maduros (**Figuras 5B e 5C**, respectivamente).

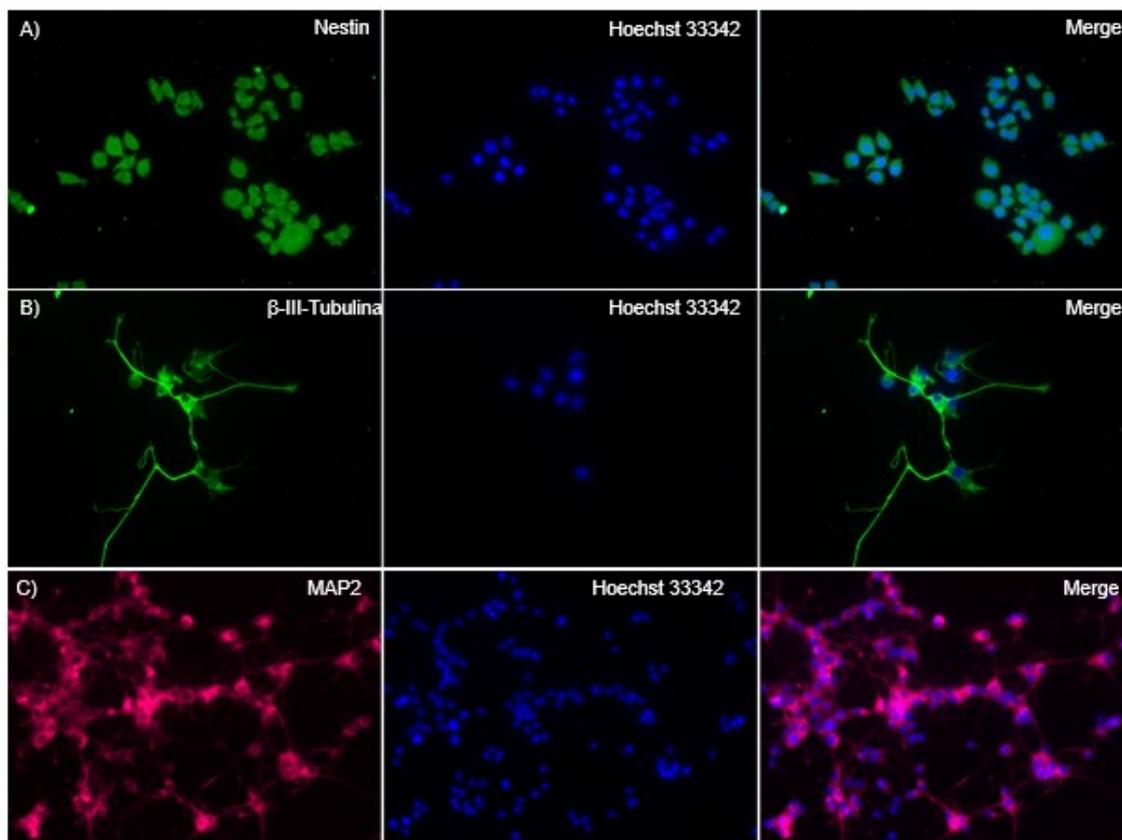


Figura 5: Imunofluorescência de marcadores neuro-específicos nas células PC12 após 7 dias de diferenciação com o NGF (50 ng/ml) (A) Células PC12 Indiferenciadas marcadas com anti-Nestin (1:500) e coloração Hoechst 33342 (0,5 μ g/mL). **(B)** Células PC12 diferenciadas em neurônios, mostrando a marcação com anti- β -III-tubulina (1:500) e coloração Hoechst 33342 (0,5 μ g/mL). **(C)** Células PC12 diferenciadas em neurônios mostrando a marcação com anti-MAP2 (1:500) e coloração Hoechst 33342 (0,5 μ g/mL). Alterações morfológicas foram observadas em aumento de 20x usando um microscópio de fluorescência Zeiss (*Axio Imager*).

4.1.3. Análise da diferenciação neuronal e neuritogênese

Após 7 dias de tratamento das células PC12 com o NGF (50 ng/ml), período de diferenciação neuronal, foi realizada a quantificação dos neurônios. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,001$) da porcentagem de diferenciação, cerca de 84,6% das células tratadas com o NGF foram diferenciadas, em comparação a 12% das

células que não foram tratadas com o NGF. Quanto ao comprimento dos neuritos, após o tratamento com o NGF, observou-se que as células aumentaram significativamente ($p < 0,001$) o comprimento médio de neuritos para 111,9 μm , em comparação a 3,5 μm observado nas células indiferenciadas (**Figuras 6A e 6B; Tabela 1**). Os resultados obtidos evidenciam que o tratamento com NGF foi capaz de induzir alterações morfológicas significativas associadas à diferenciação neuronal, em comparação ao controle negativo.

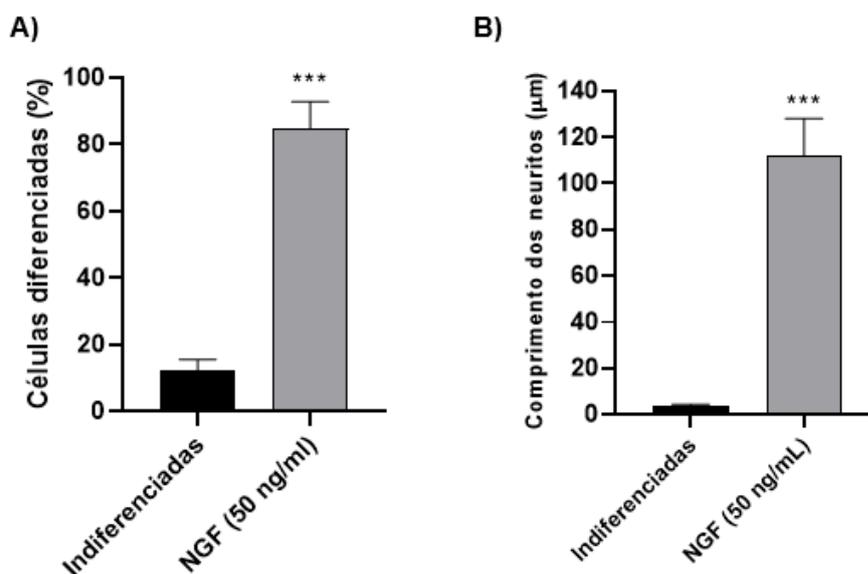


Figura 6: Quantificação de células após a neurodiferenciação por NGF em células da linhagem PC12. (A) Porcentagem de células diferenciadas após 7 dias de tratamento com NGF em comparação ao controle negativo; foram consideradas diferenciadas as células que apresentassem pelo menos um neurito com comprimento maior do que o diâmetro do corpo celular. **(B)** Análise do comprimento dos neuritos (μm) após o tratamento com o NGF em comparação com o controle negativo; foram analisadas aleatoriamente 100 células, utilizando o software *ImageJ (Fiji)*. A análise estatística foi realizada pelo teste- *t*. Valores expressos em média \pm EP. *** $p < 0,001$ indica diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos de células diferenciadas e não diferenciadas.

Tabela 1: Porcentagem de células diferenciadas após 7 dias de tratamento com NGF em comparação ao controle negativo, além da comparação do comprimento dos neuritos (μm) entre células diferenciadas após o tratamento com o NGF e o controle negativo. Foram analisadas aleatoriamente 100 células, utilizando o software *ImageJ (Fiji)*. Análise estatística realizada por meio do teste-*t*. Valores expressos em média \pm EP.

	Tratamentos (\pm Erro Padrão)	
	Indiferenciadas	NGF (50 ng/mL)
Células diferenciadas (%)	12,33	84,67***
Comprimento de neuritos (μm)	3,57 \pm 0,49	111,9 \pm 9,28***

*** $p < 0,001$ indica diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos de células diferenciadas e não diferenciadas.

4.1.4. Expressão proteica do marcador neuronal β -III-tubulina

A diferenciação neuronal induzida pelo NGF foi analisada pela quantificação da expressão proteica (por *Western blot*) do marcador neuronal β -III-tubulina, que foi avaliada em células PC12 indiferenciadas e diferenciadas. As células diferenciadas mostraram um aumento de 2,4 vezes, sendo este significativo ($p < 0,05$), na expressão de β -III-tubulina em comparação com as células PC12 indiferenciadas. O resultado foi compatível com o observado nas análises morfológicas e quantitativas, sendo comprovada a diferenciação das células PC12 em neurônios maduros, por ação do NGF (50 ng/mL) (**Figuras 7A e 7B**). Assim, os resultados apresentados demonstram que o NGF é adequado para ser utilizado como indutor de diferenciação nos experimentos subsequentes, bem como controle positivo para os ensaios de neurodiferenciação com os compostos híbridos.

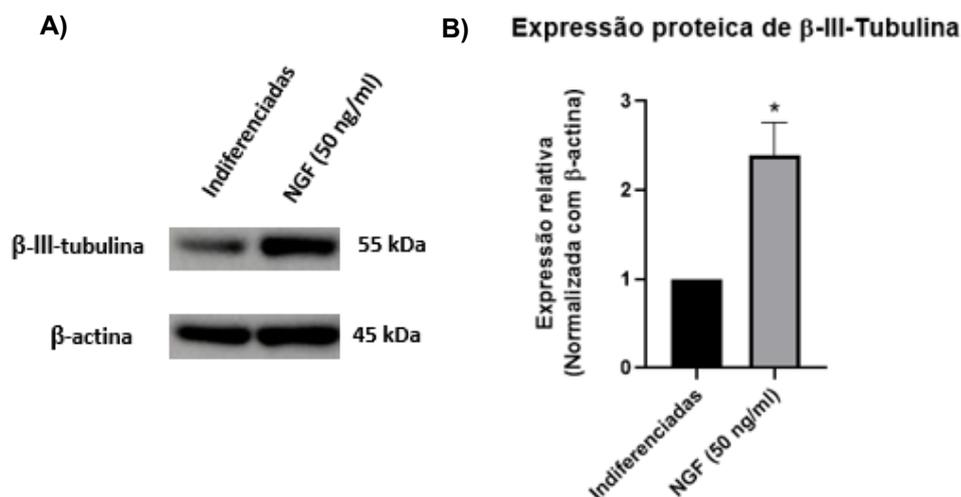


Figura 7: Análise da diferenciação neuronal nas células PC12. (A) Expressão de proteínas β -III-tubulina (~55 kDa) e β -actina (~45 kDa) analisadas por *Western blot* antes e após diferenciação neuronal. (B) Níveis de expressão de β -III-tubulina nas células indiferenciadas e diferenciadas. Os valores foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Três experimentos independentes foram realizados, sendo a análise estatística realizada pelo teste-*t*. Os dados são expressos como média \pm EP. * $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos de células diferenciadas e indiferenciadas.

4.2. Avaliação da capacidade de indução de neurodiferenciação pelos compostos AChEI nas células PC12

4.2.1. Análise de neurodiferenciação e alterações morfológicas

Com o objetivo de analisar a capacidade indutora de neurodiferenciação dos compostos TAHB3 e TA8Amino, ambos foram testados na concentração de 5 μ M. Os compostos originais donepezila e tacrina também foram analisados como controle na concentração de 10 μ M. Como controle positivo para diferenciação utilizou-se o NGF, enquanto como controle negativo foram utilizadas as células PC12 indiferenciadas. Após 7 dias de tratamento observou-se, por meio da análise de alterações morfológicas, que apenas o composto TAHB3 induziu alterações morfológicas compatíveis com a diferenciação neuronal, sendo esta identificada por meio da presença de características neuronais, como a formação de neuritos, redução do volume citoplasmático e diminuição do número de células em divisão. Tais alterações foram menos frequentes nas células tratadas com TA8Amino, donepezila e tacrina (Figuras 8A – 8F).

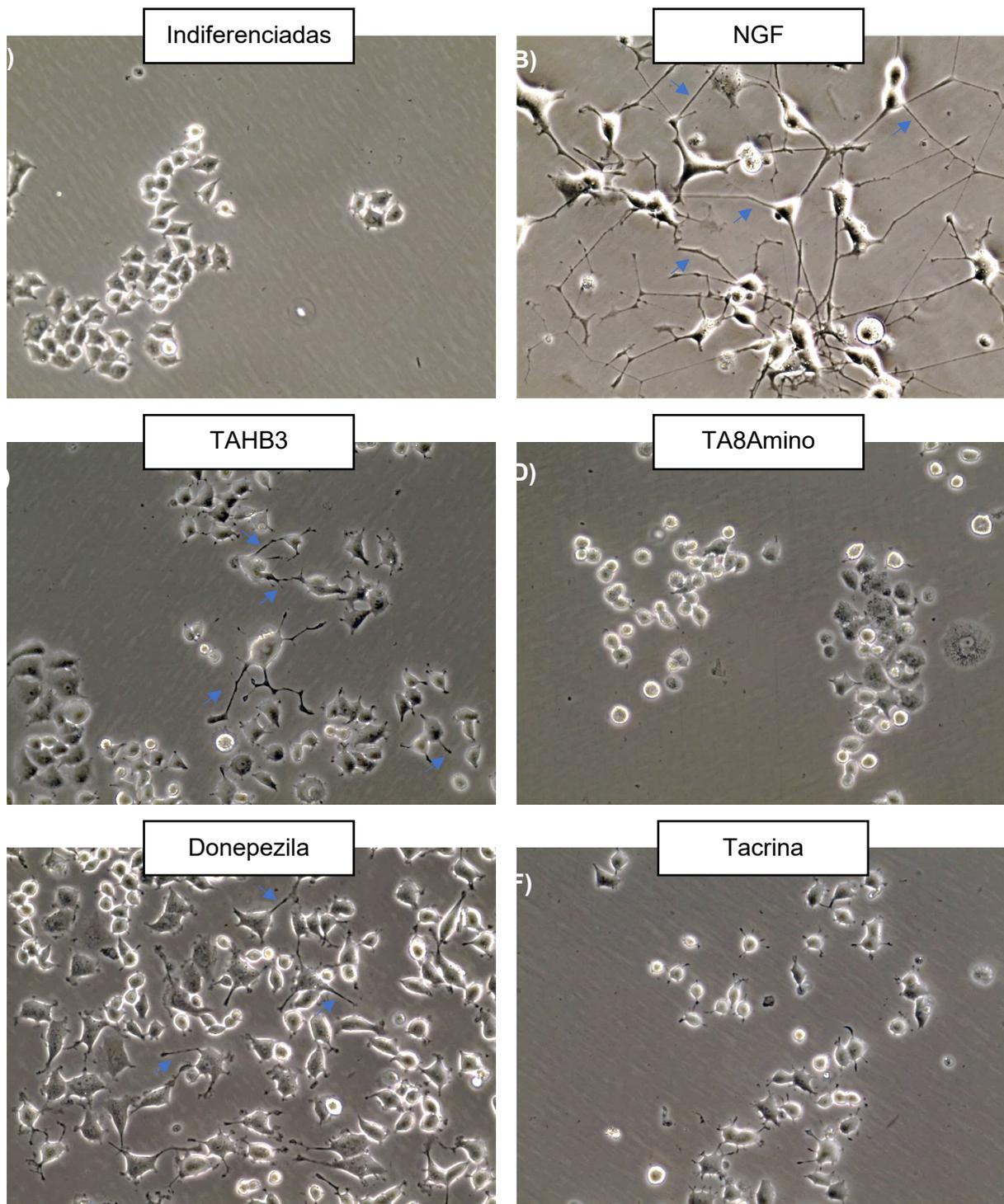


Figura 8: Células da linhagem PC12 após 7 dias de tratamento com os compostos AChEIs, na seguinte ordem: (A) Células PC12 indiferenciadas (controle negativo) (B) Tratamento com NGF 50 ng/mL (Controle positivo) (C) Tratamento com TAHB3 (5 μ M) (D) Tratamento com TA8Amino (5 μ M) (E) Tratamento com donepezila (10 μ M) (F) Tratamento com tacrina (10 μ M). As alterações morfológicas associadas à neurodiferenciação, como formação de neuritos (indicados por setas), redução do citoplasma e do número de células em divisão, foram observadas em microscópio invertido (*EVOS XL Core- Invitrogen*), sob ampliação de 40x.

4.2.2. Efeitos quantitativos dos AChEIs quanto à diferenciação neuronal e neuritogênese

Após 7 dias de tratamento com os compostos testados foi realizada a quantificação da porcentagem de células neurodiferenciadas e do comprimento dos neuritos formados. O tratamento com o controle positivo NGF promoveu a diferenciação de 81% das células. Observou-se que após o tratamento com TAHB3 a média de diferenciação das células foi 50%, um aumento significativo ($p < 0,01$) em comparação ao controle negativo (10,5%, células indiferenciadas). Resultados similares foram observados no tratamento com donepezila e tacrina, que aumentaram significativamente a porcentagem de células diferenciadas para 37,5%, em comparação ao controle negativo. Entretanto, com relação ao composto TA8Amino, este não induziu valores estatisticamente significativos de células diferenciadas, sendo obtido 17,5% (**Figura 9A; Tabela 2**).

Quanto aos dados referentes ao comprimento dos neuritos, observou-se um aumento destes após o tratamento com cada um dos compostos. A média de comprimento dos neuritos nas células indiferenciadas foi 3,9 μm , enquanto o tratamento com NGF promoveu um aumento para 111 μm . Apenas TAHB3 apresentou diferenças estatisticamente significativas (36,7 μm ; $p < 0,01$) em relação ao controle negativo. Para os compostos TA8Amino, donepezila e tacrina foram observados valores de 9,5, 19,1 e 13,8 μm , respectivamente, cujas diferenças não se mostraram estatisticamente significativas (**Figura 9B; Tabela 2**).

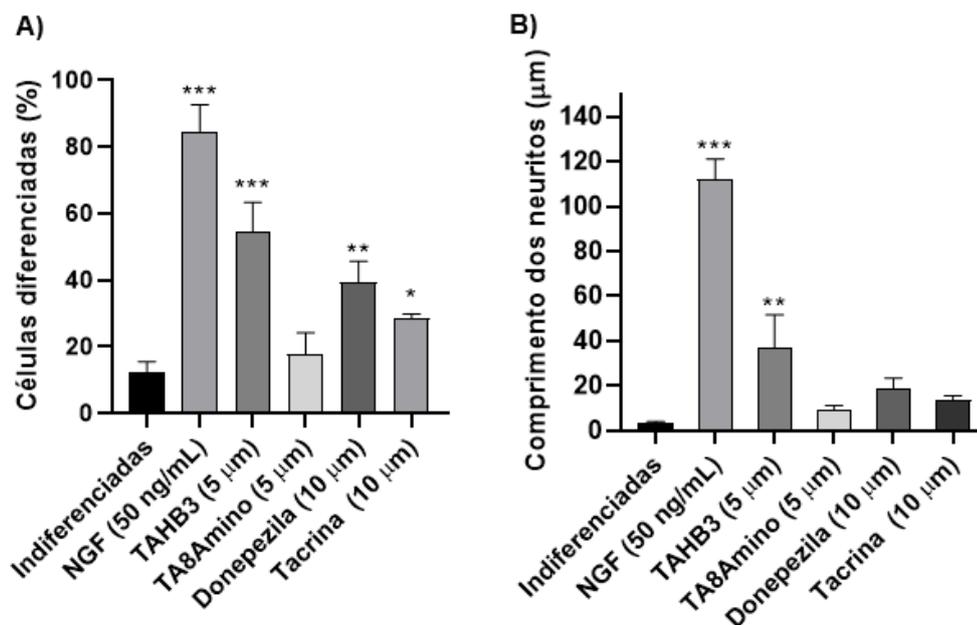


Figura 9: Efeitos dos compostos AChEIs em células neuronais diferenciadas na linhagem PC12 após 7 dias de tratamento com os compostos. (A) Foram determinadas as porcentagens de células neurodiferenciadas em 100 células analisadas por tratamento; foram consideradas como neurodiferenciadas as células que apresentaram o comprimento de pelo menos um neurito, maior do que o diâmetro do corpo celular. **(B)** O comprimento dos neuritos foram medidos em micrômetros (μm), sendo avaliadas 100 células por tratamento. As imagens foram obtidas em microscópio invertido (*Invitrogen*) sob ampliação de 40x; as análises foram feitas utilizando a ferramenta *Simple Neurite Tracer* do software *ImageJ (Fiji app)*. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Valores expressos em média \pm EP. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas, em comparação ao controle negativo. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo: células indiferenciadas); NGF 50 ng/mL (controle positivo); composto TAHB3 (5 μM); TA8Amino (5 μM); donepezila (10 μM); tacrina (10 μM).

Tabela 2: Porcentagens de células diferenciadas e comprimento dos neuritos após 7 dias de tratamento com os compostos AChEIs em comparação ao controle negativo. Foram analisadas aleatoriamente 100 células, utilizando o software *ImageJ (Fiji)*. Análise estatística realizada *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Valores expressos em média \pm EP.

	Tratamentos (\pm Erro padrão)					
	Indiferenciadas	NGF (50 ng/mL)	TAHB3	TA8Amino	Donepezila	Tacrina
Células diferenciadas (%)	12,33	84,67***	54,33***	17,67	39,33***	28,33*
Comprimento de neuritos (μm)	3,57 \pm 0,49	111,9 \pm 9,28***	36,73 \pm 8,65**	9,53 \pm 1,04	19,07 \pm 2,55	13,83 \pm 1,08

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

4.2.3. Detecção de marcadores neuronais em células PC12 tratadas com AChEIs

Após a observação das alterações morfológicas associadas à neurodiferenciação, especialmente no tratamento com o composto TAHB3, foi realizada a detecção da proteína neuro-específica β -III-tubulina, por meio de microscopia de fluorescência, visando comprovar a neurodiferenciação. Observou-se que após 7 dias de tratamento com os AChEIs, tanto as células tratadas com os compostos originais donepezila e tacrina, quanto aquelas tratadas com compostos híbridos TA8Amino e TAHB3, foram marcadas positivamente para a expressão da β -III-tubulina, embora em diferentes intensidades (**Figura 10**). Desta forma, esses resultados indicam o efeito indutor de diferenciação neuronal dos AChEIs.

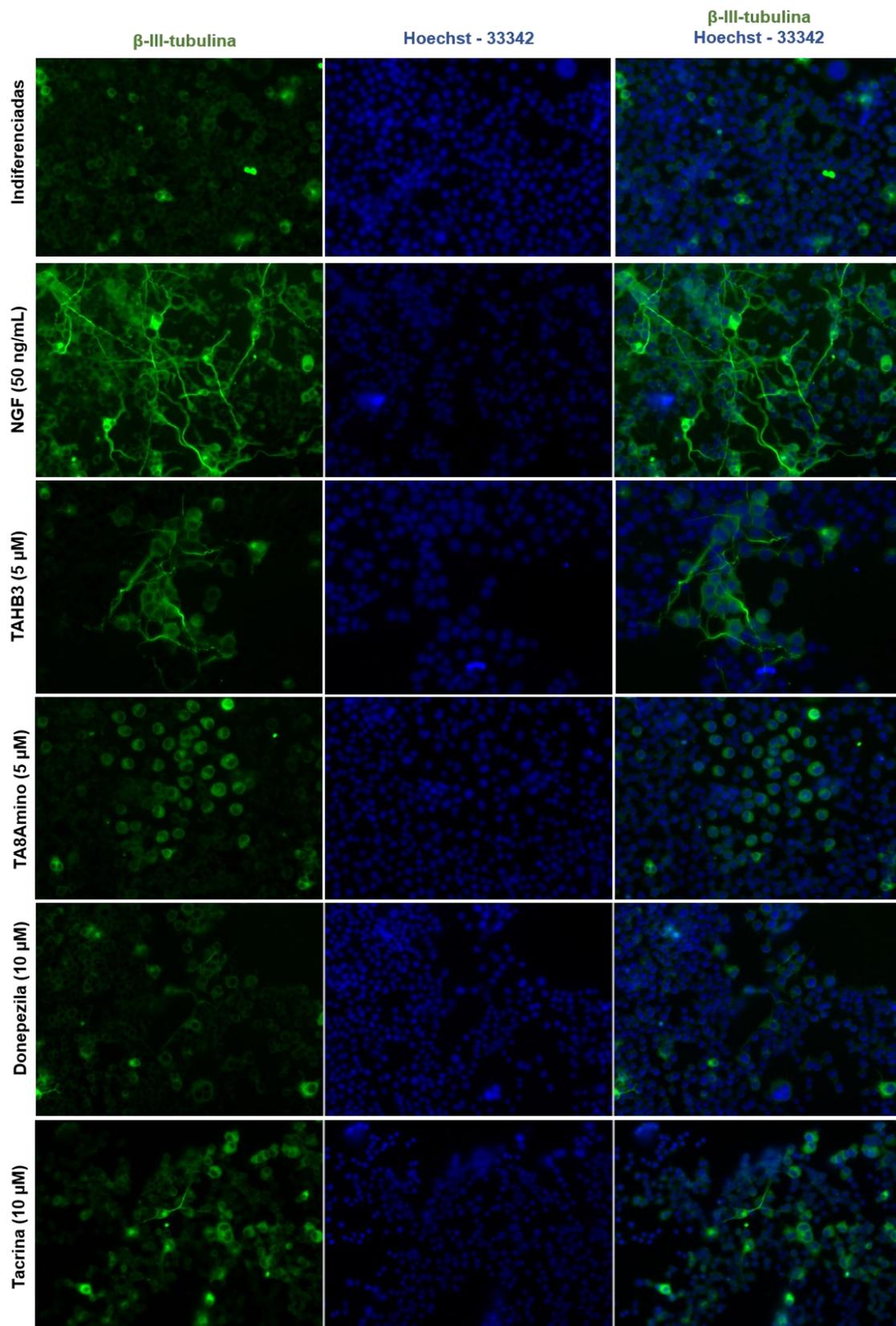


Figura 10: Imunofluorescência do marcador neuronal β -III-tubulina nas células PC12 tratadas com os AChEIs, mostrando a marcação com β -III-tubulina (1:500), e coloração Hoechst-33342 nuclear (0,5 μ g/mL). Alterações morfológicas foram observadas em aumento de 20x usando um microscópio de fluorescência Zeiss (Axio Imager). Tratamentos: Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo: células indiferenciadas); NGF 50 ng/mL (controle positivo); composto TAHB3 (5 μ M); TA8Amino (5 μ M); donepezila (10 μ M); tacrina (10 μ M).

4.2.4. Expressão proteica do marcador neuronal β -III-tubulina

A diferenciação neuronal foi confirmada pela quantificação da expressão proteica da β -III-tubulina, que foi avaliada em células PC12 tratadas por 7 dias com os AChEIs. As células tratadas com o TAHB3 demonstraram um aumento de 97% na expressão de β -III-tubulina em comparação com o controle negativo, sendo este e o controle positivo os únicos tratamentos que apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$), enquanto TA8Amino, donepezila e tacrina, apesar de exibirem aumentos de 54, 60 e 55% na expressão da β -III-tubulina, estes não foram significativos em comparação ao controle negativo (**Figuras 11A-11B; Tabela 3**). Estes resultados são compatíveis com os dados obtidos nos ensaios anteriores, comprovando a capacidade indutora de diferenciação do composto TAHB3 nas células PC12.

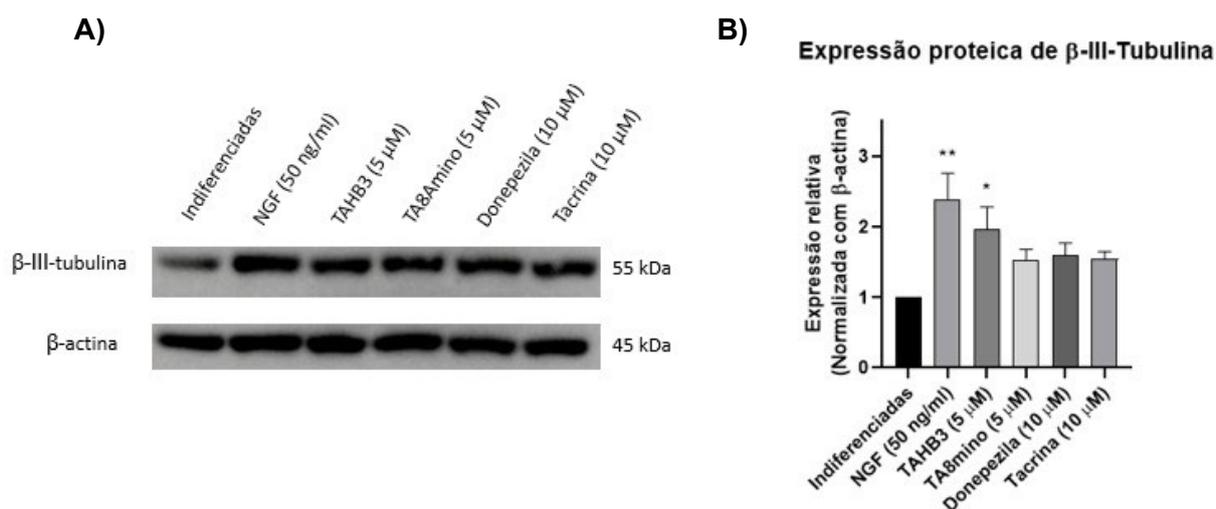


Figura 11: Diferenciação neuronal induzida pelos AChEI nas células PC12. (A) Expressão de proteínas β -III-tubulina (~55 kDa) e β -actina (~45 kDa) analisadas por *Western blotting*. **(B)** Os níveis de expressão de β -III-tubulina após 7 dias de tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Três experimentos independentes foram realizados, sendo a análise estatística realizada pelo teste *One-way Anova*, com pós-teste de *Dunnet*. Os dados são expressos como média \pm EP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo: células indiferenciadas); NGF 50 ng/mL (controle positivo); composto TAHB3 (5 μ M); TA8Amino (5 μ M); donepezila (10 μ M); tacrina (10 μ M).

Tabela 3: Níveis de expressão de β -III-tubulina após 7 dias de tratamento com os compostos AChEIs normalizados em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Três experimentos independentes foram realizados, sendo a análise estatística realizada pelo teste *One way Anova*, com pós-teste de *Dunnet*. Análise estatística realizada por meio do teste-*t*. Valores expressos em média \pm EP.

Proteína	Expressão relativa (normalizada com β -Actina)					
	Indiferenciadas	NGF (50 ng/mL)	TAHB3	TA8Amino	Donepezila	Tacrina
β -III-Tubulina	1	2,4 \pm 0,36**	1,97 \pm 0,31*	1,54 \pm 0,14	1,61 \pm 0,17	1,55 \pm 0,1

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo.

4.3. Ensaios de neuroproteção frente a danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂

4.3.1. Curva de ação do H₂O₂

Após a diferenciação das células PC12 em neurônios maduros, o ensaio de viabilidade celular foi realizado, visando identificar a concentração de H₂O₂ capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%. Foi observado que nas células PC12 diferenciadas, a concentração ideal para causar o dano esperado foi 150 μ M (**Figura 12; Tabela 4**), sendo esta utilizada nos ensaios subsequentes.

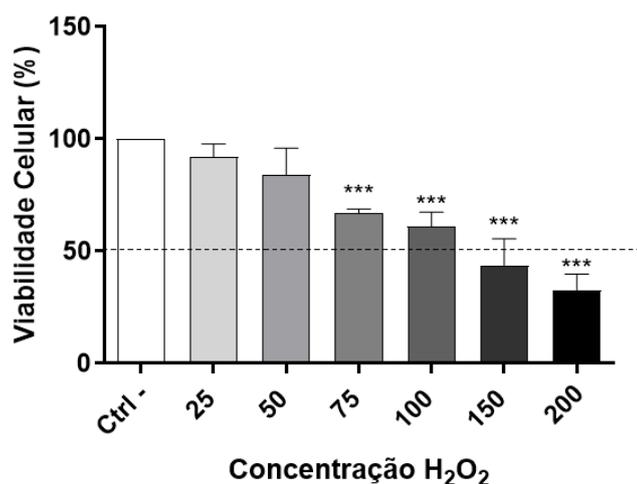


Figura 12: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações de H₂O₂ na linhagem celular PC12 após 2 h de tratamento e 24 h de recuperação. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Os valores foram obtidos de três experimentos independentes e estão expressos como Média \pm EP. *** $p < 0,001$, indicam diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo.

Tabela 4: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes concentrações de H₂O₂ na linhagem celular PC12 após 2 h de tratamento e 24 h de recuperação. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*.

H ₂ O ₂ Concentrações (µM)	Média viabilidade celular (%) (±) Erro Padrão
-	100
25	92,1 ± 3,3
50	84,1 ± 6,8
75	67,1 ± 0,98 ***
100	60,9 ± 3,8 ***
150	43,6 ± 6,9 ***
200	32,9 ± 4,1 ***

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

4.3.2. Análise da citotoxicidade e capacidade neuroprotetora dos AChEI sob estresse oxidativo em células PC12 diferenciadas

A avaliação da citotoxicidade dos compostos híbridos na linhagem celular PC12 diferenciada em neurônios maduros foi realizada por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando o *kit-XTT*, após a exposição das células por 48 h à ação dos compostos. Os resultados obtidos demonstraram que os tratamentos com os AChEIs não foram citotóxicos para a linhagem PC12. Os compostos híbridos TAHB3 e TA8Amino mantiveram a viabilidade das células em 99% e 98%, respectivamente; os compostos originais apresentaram resultados semelhantes, donepezila manteve a viabilidade celular em 100% e tacrina 93% (**Figura 13; Tabela 5**).

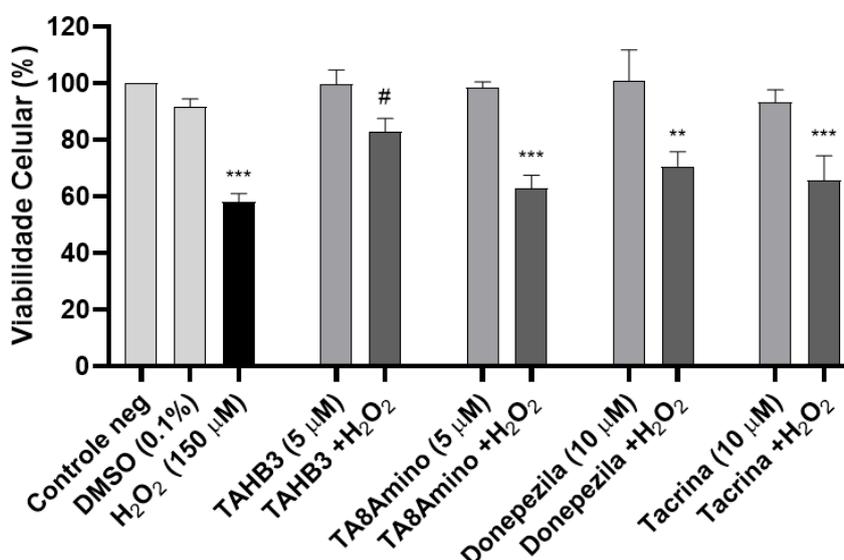


Figura 13: Porcentagens de células PC12 diferenciadas em neurônios maduros viáveis, obtidas nos ensaios de citotoxicidade e neuroproteção frente a danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Ensaio realizado utilizando o kit-XTT (*Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular Biochemicals*) e analisado por meio de espectrofotometria (*aparelho Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek*). Os valores são provenientes de quatro experimentos independentes e estão expressos em média ± EP. Análise estatística *One-Way Anova*, com pós-teste de *Dunnet*. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo. # $p < 0,05$, indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle positivo. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo); Neuronal Growth Factor 50 ng/mL (NGF, controle positivo); composto TAHB3 (5 μM); TA8Amino (5 μM); donepezila (10 μM); tacrina (10 μM).

Tabela 5: Porcentagens de viabilidade celular obtidas para diferentes tratamentos com os compostos AChEIs nos ensaios de citotoxicidade e neuroproteção frente a danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na linhagem PC12 diferenciada em neurônios maduros. Análise estatística: *One-Way* Anova com pós-teste de *Dunnet*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EP.

Citotoxicidade e neuroproteção	
Tratamentos	Média viabilidade celular (%) (±) Erro Padrão
DMEM/F10 +10 % SBF	100%
DMSO (0,1%)	91,7 ± 2,8
H₂O₂	58,2 ± 2,8***
TAHB3	99,6 ± 5,0
TAHB3 + H₂O₂	83,0 ± 4,7 #
TA8Amino	98,6 ± 4,7
TA8Amino + H₂O₂	63,1 ± 4,5 ***
Donepezila	100,1 ± 10,9
Donepezila + H₂O₂	70,8 ± 4,5 **
Tacrina	93,5 ± 4,3
Tacrina + H₂O₂	65,8 ± 8,6 ***

** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo. # $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle positivo.

Quanto ao ensaio de neuroproteção, este foi realizado submetendo as células diferenciadas já pré-tratadas com os compostos, à ação do pós-tratamento com o agente indutor de danos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A análise de viabilidade celular foi realizada em espectrofotômetro. Observou-se que as células tratadas apenas com o H₂O₂ apresentaram taxa de viabilidade média de 58%, enquanto os grupos de células pré-tratadas com TAHB3 e TA8Amino e subsequentemente submetidas à ação do H₂O₂ apresentaram um aumento da viabilidade, 82% e 63%, respectivamente; as células pré-tratadas com donepezila e tacrina e depois submetidas ao H₂O₂ apresentaram viabilidade de 70% e 65% (**Figura 13; Tabela 5**). Assim, observou-se que o pré-tratamento com o composto TAHB3 foi o único capaz de proteger os neurônios frente aos efeitos do H₂O₂, em comparação ao controle

positivo (apenas com o H₂O₂), demonstram o potencial protetor do TAHB3, frente aos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂.

4.3.3. Análise da cinética do ciclo celular após ensaio de neuroproteção com os AChEIs

A avaliação da cinética do ciclo celular foi realizada após o ensaio de neuroproteção nas células PC12 diferenciadas em neurônios. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo, utilizando o iodeto de propídio para avaliar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular.

Nas células não tratadas (controle negativo) foi observada a seguinte distribuição: células em G0/G1 (50,87%), G2/M (29,1%), S (16,3%) e fração sub-G1 (3,6%). Para os diversos tratamentos com os compostos os resultados demonstraram que nenhum dos AChEIs testados isoladamente promoveu alterações significativas na cinética do ciclo celular em comparação ao controle negativo, sendo que os resultados foram semelhantes, com poucas variações. Da mesma forma, os resultados foram similares nas células pré-tratadas com os compostos e posteriormente com o H₂O₂ (150 µM). (**Figura 14; Tabela 6**).

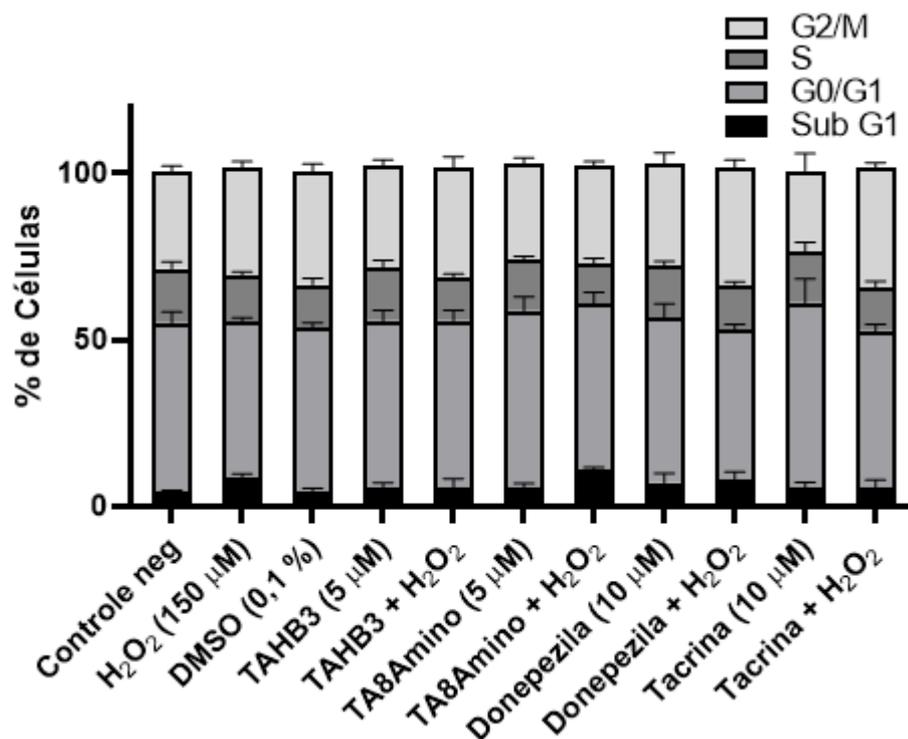


Figura 14: Cinética do ciclo celular nas células tratadas somente com os AChEIs e nas células pré-tratadas com os AChEI, frente a danos posteriormente induzidos por H₂O₂ (150 µM). Os valores são provenientes de três experimentos independentes. Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Valores expressos em média ± EP. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo); Peróxido de hidrogênio (H₂O₂, controle positivo); Dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%); composto TAHB3 (5 µM); TA8Amino (5 µM); donepezila (10 µM); tacrina (10 µM).

Tabela 6: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo obtidas no ensaio de neuroproteção frente ao dano oxidativo induzido pelo H₂O₂ (150 µM). Análise estatística: *One-Way Anova* com pós-teste de *Dunnnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EP.

Distribuição de células nas fases do ciclo celular (%) (± Erro padrão)				
Tratamentos	Fases do ciclo celular			
	SubG1	G1	S	G2/M
DMEM/F10 +10 % SBF	4,2 ± 0,6	50,87 ± 3,26	16,27 ± 2,1	29,10 ± 1,68
DMSO (0,1%)	4,5 ± 0,95	48,87 ± 1,7	13,2 ± 1,87	33,70 ± 2,46
H ₂ O ₂	8,4 ± 1,4	47,1 ± 1,15	13,7 ± 1,23	32,3 ± 1,97
TAHB3	5,77 ± 1,35	50,1 ± 3,45	16,03 ± 2,19	30,37 ± 2,09
TAHB3 + H ₂ O ₂	5,8 ± 2,5	49,97 ± 3,1	12,87 ± 1,14	32,80 ± 3,50
TA8Amino	5,77 ± 1,22	52,97 ± 4,12	15,17 ± 1,18	28,70 ± 2,06
TA8Amino + H ₂ O ₂	11,1 ± 0,62	49,8 ± 3,35	12 ± 1,52	29,13 ± 1,52
Donepezila	7,03 ± 2,87	44,63 ± 4,13	15,53 ± 1,3	30,80 ± 3,11
Donepezila + H ₂ O ₂	8,03 ± 2,29	44,8 ± 1,8	13,37 ± 1,29	35,27 ± 2,53
Tacrina	5,67 ± 1,54	56,5 ± 7,97	15,13 ± 2,92	24,47 ± 5,11
Tacrina + H ₂ O ₂	5,76 ± 2,23	46,87 ± 2,04	13,1 ± 1,82	35,70 ± 1,76

4.3.4. Avaliação da indução de morte celular pelos compostos AChEIs após ensaio de neuroproteção

Nos ensaios de indução de morte celular, as células PC12 diferenciadas em neurônios maduros foram submetidas ao protocolo de neuroproteção. A análise dos níveis de morte celular foi realizada para verificar a ação dos compostos AChEIs quanto à indução de morte celular por apoptose e necrose, sendo observado que estes não alteraram significativamente os níveis de morte celular por apoptose. Os níveis de morte observados no controle negativo foram 18,56%, enquanto que as porcentagens de morte celular por apoptose após o tratamento com os compostos híbridos foram 24,5% para o TAHB3 e 26,9% para TA8Amino, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas em relação ao controle. Dados similares foram observados no tratamento com donepezila e tacrina, que apresentaram 25,8% e 23%

de morte por apoptose, respectivamente. Esses resultados indicaram que os compostos híbridos não são citotóxicos para os neurônios diferenciados a partir das células PC12, sendo compatíveis com os resultados obtidos nos ensaios anteriores.

Quanto à análise dos níveis de morte por apoptose realizados por meio do protocolo de neuroproteção, o controle positivo elevou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de morte por apoptose para 41,3%, sendo que o mesmo foi observado no tratamento com TA8Amino e donepezila, que em conjunto com o H_2O_2 , aumentaram significativamente os níveis de apoptose para 44,7% e 41,2%, respectivamente, em comparação ao controle negativo. Já os compostos TAHB3 e tacrina, reduziram levemente os níveis de morte para 34%, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas em comparação ao controle positivo, sendo os únicos tratamentos que também não apresentaram diferenças em comparação ao controle negativo. Com relação à necrose, não houve diferenças significativas quanto às taxas de morte por necrose (**Figura 15; Tabela 7**).

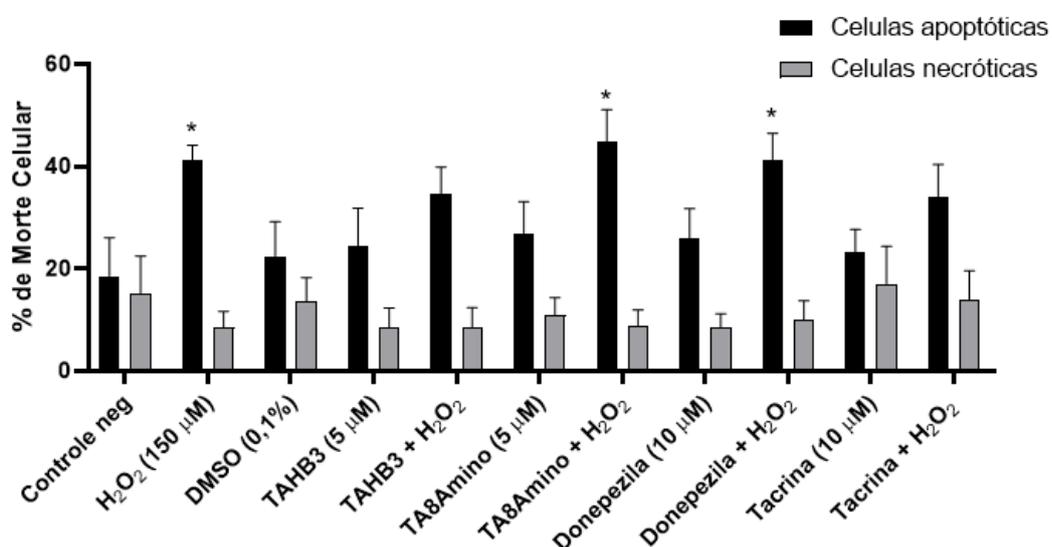


Figura 15: Análise por citometria da indução de morte celular por apoptose e necrose, frente a danos oxidativos induzidos por H_2O_2 (150 μ M) e a ação dos compostos AChEI. Análise realizada utilizando o kit *Guava Nexin* (Guava Technologies). Os valores são provenientes de três experimentos independentes. Análise estatística: *Two-Way Anova* com pós-teste de *Dunnet*. Valores expressos em média \pm EP. Células em meio de cultura DMEM/F10 + 10% SBF (controle negativo); Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , controle positivo); Dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%); composto TAHB3 (5 μ M); TA8Amino (5 μ M); donepezila (10 μ M); tacrina (10 μ M).

Tabela 7: Porcentagens de células apoptóticas e necróticas observadas no ensaio de neuroproteção frente ao dano oxidativo induzido pelo H_2O_2 (150 μM), analisados por citometria de fluxo. Análise estatística *Two-Way Anova* com pós-teste de *Dunnnett*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EP.

Morte celular (\pm Erro Padrão)		
Tratamentos	Células apoptóticas (%) Anexina V positivas	Células necróticas (%) 7-AAD positivas
DMEM/F10 +10 % SBF	18,56 \pm 7,05	15,1 \pm 7,41
DMSO (0,1%)	22,23 \pm 6,96	13,7 \pm 4,5
H ₂ O ₂	41,33 \pm 2,78*	8,5 \pm 3,16
TAHB3	24,53 \pm 7,9	8,4 \pm 3,92
TAHB3 + H ₂ O ₂	34,6 \pm 5,3	8,43 \pm 3,96
TA8Amino	26,93 \pm 6,17	11 \pm 3,35
TA8Amino + H ₂ O ₂	44,77 \pm 6,31*	8,93 \pm 3,02
Donepezila	25,8 \pm 5,90	8,47 \pm 2,7
Donepezila + H ₂ O ₂	41,17 \pm 5,29*	9,93 \pm 3,80
Tacrina	23,33 \pm 4,34	17,10 \pm 7,2
Tacrina + H ₂ O ₂	34,13 \pm 6,25	14 \pm 5,6

* $p < 0,05$, indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O processo envolvendo a perda de neurônios do sistema colinérgico possui um papel central no desenvolvimento da DA, sendo decorrente de diversos mecanismos associados ao envelhecimento por si só, além de outros fatores de risco; entre tais mecanismos, destaca-se a redução nos níveis de ACh (Hampel et al., 2018; Stanciu et al., 2019). Devido ao papel da AChE no sistema colinérgico, além do seu envolvimento em fatores não colinérgicos, como no acúmulo de peptídeos A β , a sua inibição constitui uma importante estratégia terapêutica para a DA (Sharma, 2019).

Desta forma, foram desenvolvidos fármacos inibidores de AChE (tais como donepezila, tacrina, galantamina e rivastigmina) que se tornaram a principal forma de tratamento para a DA, não apenas pela sua capacidade de inibição da AChE, mas também pelos seus efeitos neuroprotetores (Moreira et al., 2022; Ongnok et al., 2021; Takada-Takatori et al., 2006). Entretanto, estes medicamentos atuam no sentido de melhorar os sintomas nas fases iniciais da doença, não apresentando efeito de cura a médio e longo prazo (Horak et al., 2017), justificando assim a busca por novos compostos capazes de inibir a AChE de forma mais eficaz e, ao mesmo tempo, com a possibilidade de atuação em alvos múltiplos, visando proteger os neurônios dos danos comumente observados na DA.

Devido à estrutura favorável da donepezila e à sua capacidade de ligação nos sítios CAS e PAS da AChE, a utilização da sua estrutura se mostra ideal para a síntese de novos compostos híbridos capazes de se ligar em diferentes sítios da AChE (Singh et al., 2020; Sameen et al., 2017). Além disso a tacrina, apesar dos seus efeitos hepatotóxicos atribuídos ao núcleo acridina presente na sua estrutura, é um potente AChEI devido à sua forte ligação ao sítio CAS da AChE (Chierrito et al., 2017; Horak et al., 2017). Além dos efeitos de inibição da AChE, esses dois compostos também apresentam capacidade de atuar em alvos não colinérgicos, como na redução do acúmulo de peptídeos A β e do estresse oxidativo (Lahiri, 1994; Saxena et al., 2008). Dessa forma, os compostos donepezila e tacrina apresentam propriedades importantes que possibilitam a sua utilização como base para a síntese de novos compostos híbridos, que tenham maior eficácia para os pacientes com a DA (Ismaili et al., 2017).

Para a realização do presente projeto, a linhagem PC12 foi escolhida como modelo neuronal, pois além de ser um modelo amplamente utilizado no estudo de doenças neurodegenerativas, quando diferenciadas em neurônios maduros, estes apresentam a neurotransmissão colinérgica, característica essencial para estudos com AChEIs (Wiatrak et al., 2020). No presente projeto, a neurodiferenciação das células PC12 foi induzida com o NGF (50 ng/mL) durante o período de 7 dias, de acordo com o descrito por Greene e Tischler (1976); após esse período de tratamento com o NGF, as células passaram a apresentar características morfológicas de neurônios, como redução do citoplasma, desenvolvimento de neuritos e redução da proliferação. Foi observado que 84,6% das células tratadas com o NGF foram diferenciadas em neurônios, em comparação a 12% das células que não foram tratadas com o NGF.

A diferenciação em neurônios maduros com esse protocolo de tratamento foi confirmada por meio da análise de marcadores neuronais, MAP2 e β -III-tubulina, esta última, por sua vez, teve a sua expressão significativamente aumentada após a diferenciação com o NGF. Diante disso foi constatado que a utilização do NGF como indutor neuronal nas células PC12 constitui uma estratégia de diferenciação adequada para ser utilizada como controle positivo nos ensaios de neurodiferenciação, bem como para a obtenção de neurônios maduros para a realização dos ensaios de neurproteção.

A diferenciação neuronal é um importante fator a ser avaliado na pesquisa com novos compostos candidatos a fármacos para o tratamento da DA, visto que a perda neuronal é um processo determinante para o desenvolvimento dessa doença (Sung, et al., 2020; Jin et al., 2006). Estudos já demonstraram o potencial da donepezila na indução de neurogênese em modelos animais com demência e em modelos humanos *in vitro* (Kaneko et al., 2006; Kwon et al., 2014). Além disso, Man e colaboradores (2020), também observaram a capacidade da donepezila induzir a neurodiferenciação em ratos, sendo sugerido que esse processo ocorreu por meio da ativação de vias *downstream* a partir dos receptores de ACh. Por outro lado, os resultados descritos na literatura quantos aos efeitos da tacrina na diferenciação neuronal são diversos; enquanto alguns autores relataram que a tacrina inibe o crescimento de neuritos em cultura primária de células corticais (Page et al., 2015), outros descreveram que o mesmo composto foi capaz de induzir a neurogênese em células corticais de ratos (Jin et al., 2006).

Em relação ao ensaio de neurodiferenciação, os dados obtidos no presente estudo demonstraram que em células PC12 o composto TAHB3 foi capaz de induzir significativamente a neuritogênese assim como a diferenciação neuronal, sendo observado o desenvolvimento de neuritos com comprimento médio de 36,7 μm (em comparação a 3,5 μm , observado nas células indiferenciadas) e um aumento significativo na expressão do marcador neuronal β -III-tubulina. No entanto, TA8Amino, assim como donepezila e tacrina, não induziram significativamente a diferenciação neuronal. Entretanto, esses resultados foram diferentes dos resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, em que o composto TA8Amino (mas não TAHB3) demonstrou maior potencial para induzir a neurodiferenciação na linhagem SH-SY5Y (originária de neuroblastoma), a qual possui origem humana, provavelmente justificando tal discrepância nos resultados.

Ainda, é provável que essa diferença quanto à maior eficácia do TAHB3 em relação aos outros compostos nas células PC12, seja resultante de características da estrutura química dos compostos AChEI, que possam promover uma maior interação do composto TAHB3 com a AChE em ratos, visto que a conformação da AChE difere entre humanos e roedores, pois essa enzima apresenta diversos polimorfismos estruturais que variam entre diferentes espécies (Rudakova et al., 2011; Massoulié et al., 1993). Essa diferença entre os resultados obtidos em modelos humanos e de rato ressalta a importância do teste de novos compostos em diferentes modelos celulares *in vitro*, visto que as diversas variações entre as espécies podem gerar diferentes resultados quanto aos efeitos desses compostos. Tal observação evidencia a necessidade de continuar o estudo com os compostos TA8Amino e TAHB3 em novos modelos para a DA, visto que ambos os compostos testados em diferentes linhagens apresentaram efeito indutor de neurodiferenciação, uma característica importante na busca por tratamentos para a DA.

Outro aspecto analisado no presente estudo se refere aos efeitos neuroprotetores dos novos compostos híbridos TAHB3 e TA8Amino, uma vez que estes foram sintetizados de tal forma a se ligarem duplamente (dois sítios enzimáticos) a AChE, visando um maior efeito de inibição, bem como redução de efeitos colaterais atribuídos ao núcleo acridina da tacrina, o qual não foi utilizado na síntese das novas moléculas (Chierito et al., 2017). Desta forma, no presente trabalho, inicialmente foi avaliado se os compostos híbridos apresentariam efeitos citotóxicos para os neurônios

derivados das células PC12. Os dados obtidos demonstraram que os compostos híbridos na concentração de 5 μM não reduziram a viabilidade celular em comparação ao controle negativo, mantendo valores em cerca de 99% e 98% para TAHB3 e TA8Amino, respectivamente; este resultado é importante, pois indica que os novos compostos híbridos não são tóxicos para neurônios derivados a partir das células PC12. Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que os compostos TAHB3 e TA8Amino não foram citotóxicos para as células HepG2 e SH-SY5Y quando testados na concentração de 0,71 μM e 0,014 μM (Moreira, 2019); portanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os dados iniciais, mesmo nas condições em que os compostos TA8Amino e TAHB3 foram testados em maior concentração.

Uma vez identificado que os compostos híbridos não foram tóxicos para os neurônios, a etapa seguinte consistiu em analisar se TAHB3 e TA8Amino seriam capazes de proteger os neurônios frente a danos comumente observados na DA. Segundo a literatura, o estresse oxidativo constitui um dos fatores principais envolvidos na morte neuronal e desenvolvimento dessa doença; assim, a proteção contra danos oxidativos é interessante sob o ponto de vista de efeito terapêutico para os pacientes com a DA. Por ser uma das formas mais comuns de ROS e também devido à maior sensibilidade das células PC12 aos danos causados por H_2O_2 (Tönnies & Trushina, 2017; Zhang, et al 2009), no presente estudo, o composto H_2O_2 foi utilizado como agente indutor de danos oxidativos nos ensaios de neuroproteção e indução de morte celular.

Os resultados dos ensaios de neuroproteção demonstraram o potencial do composto híbrido TAHB3 em proteger os neurônios contra os danos induzidos pelo H_2O_2 , sendo observada a taxa de viabilidade de 82% para as células pré-tratadas com o TAHB3 e submetidas ao H_2O_2 , enquanto as células tratadas apenas com o H_2O_2 mostraram a sua viabilidade reduzida para 58%. Em contraste, as células pré-tratadas com o composto híbrido TA8Amino, assim como os compostos originais, donepezila e tacrina, não apresentaram diferenças significativas, demonstrando uma maior eficácia de TAHB3 quanto à indução de neuroproteção frente a danos oxidativos, em comparação aos outros compostos.

Na literatura, já foi descrito que tacrina e donepezila foram capazes de proteger células PC12 contra efeitos neurotóxicos (Svensson & Nordberg, 1998), porém ambos os compostos foram avaliados na concentração de 10 M, que é muito acima das concentrações utilizadas no presente trabalho. Outros estudos realizados com estratégias de síntese distintas, como a utilização de compostos sintetizados a partir da donepezila e hidroxitolueno butilado, demonstraram efeito neuroprotetor contra danos induzidos pelo H_2O_2 , quando testados nas concentrações de 7,5 μM e 10 μM em neurônios derivados da linhagem PC12 (Cai et al., 2018). Também foram observados efeitos neuroprotetores e antioxidantes para novos compostos híbridos de donepezila e flavonoides, avaliados na linhagem SHSY-5Y, em concentrações próximas ao IC_{50} da donepezila (Estrada et al., 2016). Nesse estudo, as concentrações que apresentaram efeitos neuroprotetores foram maiores do que a utilizada para os compostos híbridos do presente trabalho.

Outro efeito dos compostos híbridos avaliado no presente trabalho foi a capacidade destes em induzir alterações na cinética do ciclo celular dos neurônios derivados a partir das células PC12. Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos compostos AChEIs induziram alterações significativas na cinética do ciclo celular dos neurônios na concentração de 5 μM para os compostos híbridos e 10 μM para donepezila e tacrina. Nos estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, também foi observado que os compostos híbridos não induziram alterações na cinética do ciclo celular nas linhagens SH-SY5Y e HepG2, porém em concentrações mais baixas do que a utilizada no presente trabalho (Moreira, 2019). Assim, tais resultados indicam que mesmo em concentrações mais altas, TAHB3 e TA8Amino não induziram alterações significativas na cinética do ciclo celular das células PC12 diferenciadas em neurônios maduros, o que mais uma vez demonstra que ambos os compostos híbridos não são tóxicos para as células PC12 diferenciadas em neurônios.

O último parâmetro avaliado para confirmar a capacidade neuroprotetora dos compostos TA8Amino e TAHB3 foi a análise dos níveis de morte celular por apoptose e necrose. Inicialmente foi observado que nenhum dos compostos AChEIs isoladamente induziu um aumento de morte celular por apoptose ou necrose, sendo esse resultado compatível com o observado no ensaio de viabilidade celular, que demonstrou que os compostos não foram citotóxicos para os neurônios diferenciados a partir das células PC12.

Nesse ensaio, foi também observado que o composto TAHB3 foi capaz de reduzir levemente as taxas de morte celular por apoptose em relação ao controle positivo, sendo este e o tratamento com tacrina, os únicos que não apresentaram diferenças significativas nos níveis de morte em comparação ao controle negativo. O estudo realizado por Cai e colaboradores (2018), porém, em concentrações mais altas que as utilizadas no presente trabalho, demonstrou que moléculas híbridas sintetizadas a partir da donepezila e hidroxitolueno-butilado também foram capazes de reduzir significativamente as taxas de morte celular por apoptose induzidas pelo H_2O_2 em células PC12. Quanto aos níveis de morte por necrose, não foram observadas diferenças significativas. Portanto, os dados obtidos no ensaio de morte celular, em conjunto com o resultado do ensaio de viabilidade celular, demonstraram que o composto TAHB3 é capaz de proteger as células PC12 diferenciadas em neurônios frente aos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 .

Dessa forma, os resultados obtidos no presente projeto demonstram a baixa citotoxicidade dos novos compostos híbridos TAHB3 e TA8Amino, sendo que TAHB3 exibiu efeitos mais relevantes em todos os parâmetros avaliados quando comparado aos compostos originais, donepezila e tacrina, sendo assim evidenciado o potencial neuroprotetor desse composto frente a danos oxidativos, bem como a sua capacidade indutora de diferenciação nas células PC12.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- As células PC12 quando tratadas com o NGF (50 ng/mL) são significativamente diferenciadas em neurônios maduros (82%), passando a exibir características morfológicas de neurônios, com neuritos de comprimento médio de 119,9 μm e expressão dos marcadores neuronais β -III-tubulina e MAP2.
- Os compostos híbridos AChEIs TAHB3 e TA8Amino não foram tóxicos para as células PC12 diferenciadas em neurônios, quando testados na concentração de 5 μM , durante 48 h de tratamento.
- O composto híbrido TAHB3 foi capaz de induzir alterações morfológicas nas células PC12 associadas à diferenciação em neurônios maduros, sendo capaz de elevar significativamente a porcentagem de células com características neuronais para 50% e de formar neuritos com tamanho médio de 36,7 μm .
- As células PC12 tratadas com o composto TAHB3 (5 μM), durante 7 dias, apresentaram um aumento de 50% na expressão do marcador neuronal β -III-tubulina, confirmando a capacidade indutora de neurodiferenciação desse composto AChEI.
- O composto híbrido TAHB3 (5 μM) protegeu as células PC12 diferenciadas em neurônios maduros, frente aos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 , avaliados por ensaio de viabilidade celular. Já o composto TA8Amino e os compostos originais não exibiram esse potencial neuroprotetor.
- Os compostos híbridos TA8Amino e TAHB3, quando utilizados na concentração de 5 μM durante 48 h de tratamento, não alteraram significativamente a cinética do ciclo celular das células PC12 diferenciadas em neurônios.

- Os compostos híbridos TAHB3 e TA8Amino isoladamente não aumentaram significativamente os níveis de morte celular por apoptose ou necrose em comparação ao controle negativo, evidenciando que os compostos não são tóxicos para as células.
- O pré-tratamento dos neurônios diferenciados (a partir das células PC12) com os compostos híbridos seguidos da indução de danos oxidativos pelo H₂O₂ não reduziram significativamente os níveis de morte celular por apoptose. Entretanto, o tratamento com TAHB3 e tacrina reduziram levemente, mas mantendo o nível de morte sem diferenças significativas em comparação ao controle negativo.

Portanto, em todos os parâmetros avaliados, o composto híbrido TAHB3 apresentou resultados mais evidenciados, em comparação ao composto híbrido TA8Amino e aos compostos originais, donepezila e tacrina. Os resultados obtidos no presente projeto, demonstraram que o composto híbrido TAHB3 apresenta propriedades importantes na busca por novos tratamentos para a DA, pois não é citotóxico para as células PC12 diferenciadas em neurônios, além de apresentar potencial neuroprotetor frente a danos oxidativos e capacidade indutora de neurodiferenciação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkaya, Ç., Yavuzer, S.S., Yavuzer, H., Erkol, G., Bozluolcay, M., Dinçer, Y. (2017) DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione redox status in patients with Alzheimer's disease treated with and without memantine. *Journal of the Neurological Sciences*, 378, 158–162.
- 2021 Alzheimer's disease facts and figures. (2021). *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 17(3), 327–406.
- Alzheimer's Disease International. (2021). World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of Dementia. London: Alzheimer's Disease International.
- Anderson, A. P., Luo, X., Russell, W., & Yin, Y. W. (2020). Oxidative damage diminishes mitochondrial DNA polymerase replication fidelity. *Nucleic Acids Research*, 48(2), 817–829.
- Anand, P., Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. (2013) *Arch Pharm Res*. 2013 Apr;36(4):375-99.
- Arbor, S.C., LaFontaine, M., Cumbay, M. (2016) Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *The Yale journal of biology and medicine*, 89(1), 5–21.
- Ashford, J. W., & Mortimer, J. A. (2002). Non-familial Alzheimer's disease is mainly due to genetic factors. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4(3), 169–177.
- Associação Brasileira de Alzheimer. (2022). Disponível em: <https://abraz.org.br/> Acesso em: 10 out. 2022.
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 263–293.
- Baglietto-Vargas, D., Shi, J., Yaeger, D.M., Ager, R., LaFerla, F.M. (2016) Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. *Neurosci Biobehav Rev*. 64:272–287.
- Ballatore, C., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 2007 8:9, 8(9), 663–672.
- Bartus, R.T., Dean, R.L. 3rd., Beer, B., Lippa, A.S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 217(4558):408-14.
- Bassil, F., Brown, H. J., Pattabhiraman, S., Iwasyk, J. E., Maghames, C. M., Meymand, E. S., Cox, T. O., Riddle, D. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2020). Amyloid-Beta (A β) Plaques Promote Seeding and Spreading of Alpha-Synuclein and

- Tau in a Mouse Model of Lewy Body Disorders with A β Pathology. *Neuron*, 105(2), 260-275.e6.
- Berra, C.M.; Menck, C.F.M.; Mascio, P. (2006), Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quím. Nova*, 29, 1340-1344.
- Bhatia, V., & Sharma, S. (2021). Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 421(October 2020), 117253.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368(9533), 387–403.
- Bisht, S., Dada, R. (2017) Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed)* 9:420–447.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J. Jr., Krause, K.H. (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 142:13659.
- Butterfield, D. A., & Boyd-Kimball, D. (2004). Amyloid β -peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathology*, 14(4), 426–432.
- Cai, P., Fang, S. Q., Yang, H. L., Yang, X. L., Liu, Q. H., Kong, L. Y., & Wang, X. B. (2018). Donepezil-butylated hydroxytoluene (BHT) hybrids as Anti-Alzheimer's disease agents with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. *European journal of medicinal chemistry*, 157, 161–176.
- Camps, P., Formosa, X., Galdeano, C., Gomez, T., Munoz-Torrero, D., Ramírez, L. E. Viayna, E., Gomez, N. Isambert, R. Lavilla, A. Badia, M.V. Clos, M. Bartolini, F. Mancini, V. Andrisano, A. Bidon-Chanal, O. Huertas, T & Dafni, F.J.(2010) Tacrine-based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as potential disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates, *Chem. Biol. Interact*. 187: 411-415.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T. (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*.65(3):664-70.
- Chatterjee, N. & Walker, G.C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*.;58(5):235–263.
- Chen, Z. & Zhong, C. (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 30(2):271-81.
- Chierrito, T.P.C., Pedersoli-Mantoani, S., Roca, C., Requena, C., Sebastian-Perez, V., Castillo, W.O., Moreira, N.C.S., Perez, C., Sakamoto-Hojo, E.T., Takahashi, C.S., Jimenez-Barbero, J., Canada, F.J., Campillo, N.E., Martinez, A. & Carvalho, I. (2017)

From dual binding site acetylcholinesterase inhibitors to allosteric modulators: A new avenue for disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 139, 773-791.

Chong, F.P., Ng, K.Y., Koh, R.Y. & Chye, S.M., (2018) Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol.* 38(5):965–980.

Chu, D. & Liu F. (2019). Pathological Changes of Tau Related to Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 10(2):931-944.

De Falco, A., Cukierman, D.S., Hauser-Davis, R. A. & Rey, N. A. (2016) Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Química Nova*, 39(1), 63-80.

De Ferrari, G. V., Canales, M. A., Shin, I., Weiner, L. M., Silman, I., & Inestrosa, N. C. (2001). A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. *Biochemistry*, 40(35), 10447–10457.

Domingues, C., da Cruz, E., Silva, O.A.B. & Henriques, A.G., (2017). Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer's Disease Neuropathological Hallmarks. *Curr Alzheimer Res.*14(8):870–882.

Eriksson, P. S., Perrfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Cage, F. H. (1998). *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317.

Estrada, M. Herrera-Arozamena, C., Pérez, C., Viña, D., Romero, A., Morales-García, J.A., Pérez-Castillo, A. & Rodríguez-Franco, M.I. (2016) New cinnamic - N-benzylpiperidine and cinnamic - N,N-dibenzyl(N-methyl)amine hybrids as Alzheimer-directed multitarget drugs with antioxidant, cholinergic, neuroprotective and neurogenic properties. *Eur J Med Chem.* 121:376-386.

Ferreira, R. S., dos Santos, N. A. G., Martins, N. M., Fernandes, L. S., & dos Santos, A. C. (2018). Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Protects PC12 Cells from Cisplatin-Induced Neurotoxicity by Activating the NGF-Signaling Pathway. *Neurotoxicity Research*, 34(1), 32–46.

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*, 14(1), 101–115.
<https://doi.org/10.1038/nrn2147>

Gao, Y., Tan, L., Yu, Jin-Tai, & Tan, L. (2018) Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Current Alzheimer Research*, 15(3).

Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 481–488.

Greene, L.A. & Tischler, A.S. (1976) 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, 73(7), 2424–2428.

Greene, L. A., & Rein, G. (1977). Synthesis, storage and release of acetylcholine by a noradrenergic pheochromocytoma cell line. *Nature*, 268(5618), 349–351.

Grimm, A., & Eckert, A. (2017). Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *Journal of Neurochemistry*, 143(4), 418–431.

Grossberg, G.T. (2003) Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr Ther Res Clin Exp.* 64(4):216-35.

Gyls, K. H. E. A. (2004). Synaptic Changes in Alzheimer's Disease Accompanied by Decreased PSD-95 Fluorescence. *American Journal of Pathology*, 165(5), 1809–1817.

Haq, S.H., Aiafaeq, N.O. & Johari, R.A. (2019). Vitamin D Treatment Reverses the Induced Oxidative Stress Damage to DNA. *Pak J Biol Sci.* 22(1):8–14.

Hempel, H., Mesulam, M.M., Cuello, A.C., Farlow, M.R., Giacobini E., Grossberg, G.T., Khachaturian, A.S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P.J. & Khachaturian, Z.S. (2018) The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain.* 141(7):1917-1933.

Hempel, H., Mesulam, M.M., Cuello, A.C., Khachaturian, A.S., Vergallo, A., Farlow, M.R., Snyder, P.J., Giacobini, E. & Khachaturian, Z.S. (2019) Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *J Prev Alzheimers Dis.* 6(1):2-15.

Hardy, J.A. & Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054):184–185.

Haughey, N. J., Nath, A., Chan, S. L., Borchard, A. C., Rao, M. S., & Mattson, M. P. (2002). Disruption of neurogenesis by amyloid β -peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 83(6), 1509–1524.

Horak, M., Holubova, K., Nepovimova, E., Krusek, J., Kaniakova, M., Korabecny, J., Vyklicky, L., Kuca, K., Stuchlik, A., Ricny, J., Vales, K., & Soukup, O. (2017). The pharmacology of tacrine at N-methyl-d-aspartate receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 75, 54–62.

Howard, R., McShane, R., Lindesay, J., Ritchie, C., Baldwin, A., Barber, R., Burns, A., Dening, T., Findlay, D., Holmes, C., Hughes, A., Jacoby, R., Jones, R., Jones, R., McKeith, I., Macharouthu, A., O'Brien, J., Passmore, P., Sheehan, B., Juszczak, E., Katona, C., Hills, R., Knapp, M., Ballard, C., Brown, R., Banerjee, S., Onions, C., Griffin, M., Adams, J., Gray, R., Johnson, T., Bentham, P. & Phillips P. (2020).

- Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 366(10):893-903.
- Imamura, O., Arai, M., Dateki, M., Oishi, K., & Takishima, K. (2020). Donepezil-induced oligodendrocyte differentiation is mediated through estrogen receptors. *Journal of Neurochemistry*, 155(5), 494–507.
- Ionescu-Tucker, A., & Cotman, C. W. (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 107, 86–95.
- Islam, M.T. (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 39(1):73-82.
- Ismaili, L., Refouvelet, B., Benchekroun, M., Brogi, S., Brindisi, M., Gemma, S., Campiani, G., Filipic, S., Agbaba, D., Esteban, G., Unzeta, M., Nikolic, K., Butini, S., & Marco-Contelles, J. (2017). Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 151, 4–34.
- Jin, K., Xie, L., Mao, X. O., & Greenberg, D. A. (2006). Alzheimer's disease drugs promote neurogenesis. *Brain research*, 1085(1), 183–188.
- Johnson, J., Mercado-Ayon, E., Mercado-Ayon, Y., Dong, Y. N., Halawani, S., Ngaba, L., & Lynch, D. R. (2021). Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 702, 108698.
- Kadioglu, E., Sardas, S., Aslan, S., Isik, E. & Esat Karakaya, A. (2004) Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers.* 9(2):203–209.
- Kandimalla, R.J., Prabhakar, S. & Binukumar, B.K. (2011) Apo-E ϵ 4 allele in conjunction with A β 42 and tau in CSF: biomarker for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 8(2):187–196.
- Kaneko, N., Okano, H., & Sawamoto, K. (2006). Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes to Cells*, 11(10), 1145–1159.
- Kaneko, N., & Sawamoto, K. (2009). Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neuroscience Research*, 63(3), 155–164.
- Kwiatkowski, D., Czarny, P., & Toma, M. (2016). Associations between DNA Damage, DNA Base Excision Repair Gene Variability and Alzheimer's Disease Risk. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 41(3-4):152–171.
- Kwon, K.J., Kim, M.K., Lee, E.J., Kim, J.N., Choi, B.R., Kim, S.Y., Cho, K.S., Han, J.S., Kim, H.Y., Shin, C.Y., Han, S.H. (2014). Effects of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, on neurogenesis in a rat model of vascular dementia. *J Neurol Sci.* 347(1-2):66-77.

- Lahiri, D. K. (1994). Reversibility of the effect of tacrine on the secretion of the β -amyloid precursor protein in cultured cells. *Neuroscience Letters*, 181(1–2), 149–152.
- Lane, R. M., Kivipelto, M., & Greig, N. H. (2004). Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clinical Neuropharmacology*, 27(3), 141–149.
- Liu, L., Sun, T., Xin, F., Cui, W., Guo, J., & Hu, J. (2017). Nerve Growth Factor Protects Against Alcohol-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells via PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Alcohol and Alcoholism*, 52(1), 12–18.
- Leandro, G.S. Evangelista, A.F., Lobo, R.R., Xavier, D.J., Moriguti, J.C. & Sakamoto-Hojo, E.T. (2018) Changes in Expression Profiles Revealed by Transcriptomic Analysis in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Alzheimer's Disease Patients. *Journal of Alzheimer's Disease* 66, 1483–1495.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269(5226):973-7.
- Lin, X., Kapoor, A., Gu, Y., Chow, M.J., Peng, J., Zhao, K. & Tang D. (2020) Contributions of DNA Damage to Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 21(5):1666.
- Liu, X.H., Ning, F.B., Zhao, D.P., Chang, Y.Y., Wu, H.M., Zhang, W.H., Yu, A.L. (2021) Role of miR-211 in a PC12 cell model of Alzheimer's disease via regulation of neurogenin 2. *Exp Physiol*. 106(4):1061-1071.
- Long, J.M. & Holtzman, D.M. (2019) Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 179(2):312-339.
- Man, J., Cui, K., Fu, X., Zhang, D., Lu, Z., Gao, Y., Yu, L., Li, N., Wang J. (2020). Donepezil promotes neurogenesis via Src signaling pathway in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res*. 1736:146782.
- Martinez, A., & Castro, A. (2006) Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15(1), 1–12.
- Martins, I.J., Berger, T., Sharman, M.J., Verdile, G., Fuller, S.J. & Martins, R.N. (2009). Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 111: 1275-1308.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology*, 41(1), 31–91.
- Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling RA & Cummings, J.L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*.15;1:15056.

- McShane, R., Westby, M. J., Roberts, E., Minakaran, N., Schneider, L., Farrimond, L. E., Maayan, N., Ware, J., & Debarros, J. (2019). Memantine for dementia. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3(3), CD003154.
- McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2003). Clinically tested drugs for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12(7), 1143–1151.
- More, S. V., Koppula, S., Kim, I. S., Kumar, H., Kim, B. W., & Choi, D. K. (2012). The role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth. *Molecules*, 17(6), 6728–6753.
- Moreira, N.C.D.S. (2019) Diferenciação neuronal e efeito neuroprotetor de novas moléculas híbridas inibidoras de acetilcolinesterase em modelo SH-SY5Y Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Moreira, N.C.D.S., Lima, J.E.B.F., Chierrito, T.P.C., Carvalho, I. & Sakamoto-Hojo ET. (2020) Novel Hybrid Acetylcholinesterase Inhibitors Induce Differentiation and Neuritogenesis in Neuronal Cells in vitro Through Activation of the AKT Pathway. *J Alzheimers Dis.*78(1):353-370.
- Moreira, N. C. D. S., Lima, J. E. B. de F., Marchiori, M. F., Carvalho, I., & Sakamoto-Hojo, E. T. (2022). Neuroprotective Effects of Cholinesterase Inhibitors: Current Scenario in Therapies for Alzheimer's Disease and Future Perspectives. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 6(1), 177.
- Motta, M., Imbesi, R., DiRosa, M., Stivala, F. & Malaguarnera, L. (2007). Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression. *Immunol Lett.* 114(1):46–51.
- Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J. & Lewczuk, P. (2018). Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* (Vienna). 125(2):177-191.
- Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., Castellani, R. J., Crain, B. J., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Haroutunian, V., Hof, P. R., Hulette, C. M., Hyman, B. T., Iwatsubo, T., Jellinger, K. A., Jicha, G. A., Kövari, E. & Beach, T. G. (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 71(5), 362–381.
- Newcombe, E.A., Camats-Perna, J., Silva, M.L., Valmas, N., Huat, T.J. & Medeiros, R. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. (2018). *J Neuroinflammation*. 15(1):276.
- Ongnok, B., Khuanjing, T., Chunchai, T., Kerdphoo, S., Jaiwongkam, T., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2021). Donepezil provides neuroprotective effects against brain injury and Alzheimer's pathology under conditions of cardiac ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(1), 165975.

- Ohnuma, K., Hayashi, Y., Furue, M., Kaneko, K., Asashima, M. (2005). Serum-free culture conditions for serial subculture of undifferentiated PC12 cells. *J Neurosci Methods*. 151(2):250-61.
- Page, M., Pacico, N., Ourtioualou, S., Deprez, T., Koshibu, K. (2015). Procognitive Compounds Promote Neurite Outgrowth. *Pharmacology*. 96(3-4):131-6.
- Sung, P. S., Lin, P. Y., Liu, C. H., Su, H. C., & Tsai, K. J. (2020). Neuroinflammation and Neurogenesis in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 701.
- Piazzini, L., Rampa, A., Bisi, A., Gobbi, S., Belluti, F., Cavalli, A., Bartolini, M. Andrisano, V. Valenti, P. & Recanatini, M. (2003). 3-(4-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) Inhibits Both Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase-Induced β -Amyloid Aggregation: A Dual Function Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *J. Med. Chem.* 46, 2279– 2282.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. & Bitto A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 8416763.
- Popova, D., Karlsson, J. & Jacobsson, S.O.P. (2017). Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity. *BMC Pharmacol Toxicol*. 18(1):42.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592–607.
- Qizilbash, N., Whitehead, A., Higgins, J., Wilcock, G., Schneider, L. & Farlow, M. (1998) Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials. Dementia Trialists' Collaboration. *JAMA*. 280(20):1777-82.
- Rafieipour, F., Hadipour, E., Emami, S.A., Asili, J., Tayarani-Najaran, Z., (2019) Safranal protects against beta-amyloid peptide-induced cell toxicity in PC12 cells via MAPK and PI3 K pathways. *Metab Brain Dis*. 34(1):165-172
- Rees, T., Hammond, P.I., Soreq, H., Younkin, S. & Brimijoin, S. (2003) Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol Aging*. 24(6):777-87.
- Ribezzo, F., Shiloh, Y. & Schumacher, B. (2015). Systemic DNA damage responses in aging and diseases. *Semin Cancer Biol*. 2016;37-38:26–35.
- Ricciarelli, R., & Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Current Neuropharmacology*, 15(6), 926–935.
- Rudakova, E. V., Boltneva, N. P., & Makhaeva, G. F. (2011). Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 152(1), 73–75.

- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts, C. Hulette, B. Crain, D. Goldgaber, A. D. & Roses. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 43(8):1467–1472.
- Saxena, G., Singh, S. P., Agrawal, R., & Nath, C. (2008). Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *European Journal of Pharmacology*, 581(3), 283–289.
- Selkoe, D.J. & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 8(6):595-608.
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol Med Rep*. 20(2):1479-1487.
- Shen, J.N., Wang, D.S. & Wang, R. (2012). The protection of acetylcholinesterase inhibitor on β -amyloid-induced the injury of neurite outgrowth via regulating axon guidance related genes expression in neuronal cells. *Int J Clin Exp Pathol*.5(9):900-913.
- Shentu, Y. P., Huo, Y., Feng, X. L., Gilbert, J., Zhang, Q., Liuyang, Z. Y., Wang, X. L., Wang, G., Zhou, H., Wang, X. C., Wang, J. Z., Lu, Y. M., Westermarck, J., Man, H. Y., & Liu, R. (2018). CIP2A Causes Tau/APP Phosphorylation, Synaptopathy, and Memory Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Reports*, 24(3), 713–723.
- Silva, A.R., Santos, A.C., Farfel, J.M., Grinberg, L.T., Ferretti, R.E., Campos, A.H., Cunha, I.W., Begnami, M.D., Rocha, R.M., Carraro, D.M., de Bragança, P.C.A., Jacob-Filho, W. & Brentani H. (2014) Repair of oxidative DNA damage, cell-cycle regulation and neuronal death may influence the clinical manifestation of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 9(6):e99897.
- Song, Z., Han, X., Shen, L., Zou, H., Zhang, B., Liu, J., & Gong, A. (2018). PTEN silencing enhances neuronal proliferation and differentiation by activating PI3K/Akt/GSK3 β pathway in vitro. *Experimental Cell Research*, 363(2), 179–187.
- Sorrentino, V., Menzies, K.J. & Auwerx, J. (2018) Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.58:353-389.
- Spires-Jones, T.L. & Hyman, B.T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 82(4):756–771.
- Sereniki, A. & Vital, M.A.B.F. (2008) A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev. psiquiatr*. 30.
- Shao, D., Zou, C., Luo, C., Tang, X. & Li Y. (2004) Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett*. 14(18):4639-42.

- Stanciu, G.D., Luca, A., Rusu, R.N., Bild, V., Beschea-Chiriac, S.I., Solcan, C., Bild, W. & Ababei, D.C. (2019) Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules*.;10(1):40.
- Svensson, A.-L., & Nordberg, A. (1998). *Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of A β (25-35) in rat PC12 cells*. *NeuroReport*, 9(7), 1519–1522.
- Swerdlow, R.H., Burns, J.M. & Khan, S.M. (2014). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta*. 1842(8):1219–1231.
- Takada-Takatori, Y., Kume, T., Sugimoto, M., Katsuki, H., Niidome, T., Sugimoto, H., Fujii, T., Okabe, S., & Akaike, A. (2006). Neuroprotective effects of galanthamine and tacrine against glutamate neurotoxicity. *European journal of pharmacology*, 549(1-3), 19–26.
- Tian, M., Lin, X., Wu, L., Lu, J., Zhang, Y., & Shi, J. (2019). Angiotensin II triggers autophagy and apoptosis in PC12 cell line: An in vitro Alzheimer's disease model. *Brain research*, 1718, 46–52.
- Tobore, T.O. (2019) On the central role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurol Sci*. 40(8):1527–1540.
- Tönnies, E. & Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 57(4):1105–1121.
- Uddin, M.S., Kabir, M.T., Al Mamun, A., Abdel-Daim, M.M., Barreto, G.E., Ashraf, G.M. (2019). APOE and Alzheimer's Disease: Evidence Mounts that Targeting APOE4 may Combat Alzheimer's Pathogenesis. *Mol Neurobiol*. 56(4):2450-2465.
- Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P., & Eiden, L. E. (2002). Signaling Pathways for PC12 Cell Differentiation: Making the Right Connections. *Science*, 296(5573), 1648–1649.
- Ventura, A.L.M., Abreu, P.A., Freitas, R.C.C., Sathler, Plínio C., Loureiro, N. & Castro, H.C. (2010) Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Archives of Clinical Psychiatry*. 37(2), 66-72.
- Vesey, R., Birrell, J.M., Bolton, C., Chipperfield, R.S., Blackwell, A.D., Dening, T.R. & Sahakian, B.J. (2002). Cholinergic nicotinic systems in Alzheimer's disease: prospects for pharmacological intervention. *CNS Drugs*. 16(7):485-500.
- Verwilt, P., Kim, H. S., Kim, S., Kang, C., & Kim, J. S. (2018). Shedding light on tau protein aggregation: the progress in developing highly selective fluorophores. *Chemical Society Reviews*, 47(7), 2249–2265.
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. gon, & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1240–1247.

- Watkins, P. B. (1994). Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 271(13), 992–998.
- Weissman, L., Jo, D.G., Sørensen, M.M., de Souza-Pinto, N.C., Markesbery, W.R., Mattson, M.P., Bohr, V.A. (2007) Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res.* ;35(16):5545-55.
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., & Barg, E. (2020). PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4).
- Wiesner, J., Kříz, Z., Kuca, K., Jun, D., & Koca, J. (2007). Acetylcholinesterases - The structural similarities and differences. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(4), 417–424.
- Wu, L. L., Chiou, C.-C., Chang, P.-Y., & Wu, J. T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta*, 339(1-2), 1–9.
- Wu, J., Yin, C., Hwang, C., Tang, D., & Yang, N.A.D. (2014). Attenuates oxidative DNA damages induced by amyloid beta-peptide in primary rat cortical neurons, *Free Radic. Res.* 48 794–805.
- Yuksel, M., & Tacal, O. (2019). Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: An up-to-date review. *European Journal of Pharmacology*, 856, 172415.
- Zhang, J., Zhu, D., Sheng., R. Wu, R., Hu, Y., Wang, F., Cai, T., Yang, B., & He, Q. (2009). a novel acetylcholinesterase inhibitor, significantly improved chemicals-induced learning and memory impairments on rodents and protected PC12 cells from apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Eur J Pharmacol.* 613(1-3):1-9.
- Zeng, Z., Xu, J., & Zheng, W. (2017). Artemisinin protects PC12 cells against β -amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Redox biology*, 12, 625–633.