Título: A inibição de ROCK e PTEN promove neurogênese e neuritogênese via PI3K/AKT em modelos 2D e 3D de células neurais: uma potencial estratégia terapêutica para a doença de Alzheimer.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e complexa, sendo que a terapia para os pacientes com essa doença se baseia na utilização de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChEIs), uma das principais classes de medicamentos. No entanto, existe ainda um imenso desafio quanto ao desenvolvimento de compostos eficazes e dotados de baixa citotoxicidade e de efeitos colaterais para os pacientes. Nesse sentido, a ativação via PI3K/AKT tem sido considerada uma estratégia promissora para promover efeitos neuroprotetores. Essa via molecular é uma importante cascata de sinalização capaz de causar um impacto funcional significativo nos neurônios. Segundo a literatura, a proteína PTEN apresenta um papel importante na regulação negativa da via PI3K/AKT, provavelmente contribuindo como um evento patológico na DA, sendo que PTEN é regulado positivamente por ROCK. Há evidências de que os efeitos da inibição da PTEN e ROCK causaram um aumento na diferenciação e sobrevivência neuronal em modelos experimentais estudados, indicando que essas proteínas podem constituir possíveis alvos de intervenção molecular a serem investigados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Assim, a hipótese do presente trabalho é que um novo composto AChEI, TA8Amino, poderia atuar na inibição da AChE e da proteína ROCK2, resultando na inativação de *PTEN* e, consequentemente, na ativação da sinalização PI3K/AKT, promovendo a neurodiferenciação e neuritogênese em células da linhagem SH-SY5Y, utilizada como modelo experimental. Além disso, uma outra hipótese testada foi que a modulação direta de *PTEN* ou de ROCK poderia promover neuroproteção e a neurogênese, por meio da ativação da via de sinalização AKT. Portanto, o objetivo consistiu em caracterizar o potencial terapêutico do novo composto TA8Amino na indução da neurodiferenciação em células SH-SY5Y. Além disso, um outro objetivo foi elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na indução de neurogênese e neuritogênese pela ativação da sinalização PI3K/AKT, utilizando estratégias de inibição de *PTEN* (*knockdown* por siRNA) e dos inibidores farmacológicos Y-27632 (inibidor de ROCK) e LY294002 (inibidor de PI3K/AKT) em modelos 2D e 3D de células neurais. Inicialmente, foram avaliados os efeitos do tratamento com AChEIs (TA8Amino, donepezila e tacrina) nas células SH-SY5Y indiferenciadas e neurodiferenciadas. TA8Amino foi capaz de inibir a AChE em concentrações não citotóxicas após 24 h, sendo que após 7 dias de diferenciação neuronal, TA8Amino e donepezila aumentaram as porcentagens de células neurodiferenciadas, bem como o comprimento dos neuritos; a diferenciação neuronal foi confirmada pela expressão da proteína β-III-tubulina e MAP2. Foi demonstrado que o composto TA8Amino induziu a ativação da sinalização PTEN/AKT. Por meio de um estudo *in silico*, foi estimado que TA8Amino pode se ligar de forma estável ao sítio ativo da proteína ROCK2. Experimentos

in vitro em células SH-SY5Y demonstraram que o tratamento com TA8Amino reduziu significativamente a expressão da proteína ROCK2, em contraste com donepezila e tacrina. Portanto, esses resultados fornecem informações importantes sobre o mecanismo subjacente à ação de TA8Amino, com relação às atividades de múltiplos alvos. Uma vez demonstrado no presente estudo que a sinalização ROCK/PTEN/AKT se mostra relevante, implicada nos mecanismos de neurogênese, na sequência, foram avaliados os efeitos da inibição de ROCK pelo composto Y-27632 nas células SH-SY5Y; os resultados indicaram que ROCK promoveu o crescimento de neuritos e a diferenciação neuronal no modelo de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Adicionalmente, as células SH-SY5Y foram submetidas à inibição de *PTEN* por siRNA, seguindo vários ensaios para estudar a indução da neurogênese e da neuritogênese em diferentes tempos de análise. Foi também avaliada a expressão das principais proteínas chaves da via PI3K/AKT. A inibição de *PTEN* aumentou o comprimento dos neuritos e reduziu o tamanho citoplasmático, indicando a indução da diferenciação neuronal nas células SH-SY5Y, na ausência de indução de alterações nas taxas de proliferação e na cinética do ciclo celular. As análises de expressão proteica dos principais componentes da via AKT/GSK3-β/Tau mostraram que a inibição da *PTEN* foi capaz de modular seus níveis de expressão, levando a uma redução na fosforilação da Tau. Foi também demonstrado que o inibidor de PI3K (LY492002) previne a diferenciação neuronal induzida pela inibição de *PTEN*. Na próxima etapa, foi testada se a inibição de *PTEN* resultaria nos mesmos efeitos em culturas 2D e 3D de neurônios diferenciados de células progenitoras neurais humanas, derivadas de iPSCs (*induced-pluripotent stem cells*), oriundas de individuo não afetado. A caracterização da diferenciação neural das células NPCs 2D e 3D indicou a viabilidade de obtenção de neurônios maduros e neuritos alongados e densos. Aplicou-se também um ensaio de neuroproteção visando avaliar os efeitos da inibição de *PTEN* frente aos danos neurotóxicos induzidos pelo ácido ocadáico; a inibição de *PTEN* promoveu a recuperação da viabilidade neuronal, bem como o crescimento de neuritos após a indução de danos em ambos os modelos 2D e 3D de neurônios diferenciados de NPCs. Em conjunto, de forma geral, os dados do presente trabalho são interessantes e fornecem informações importantes sobre o mecanismo de ação do composto TA8Amino relacionada à sua atuação simultânea em dois diferentes alvos (ROCK e PTEN); a pesquisa sobre a inibição destes mostrou dados interessantes sobre o impacto da mesma, fornecendo suporte ao potencial de ambos como alvos moleculares terapêuticos por meio da via PI3K/AKT, com consequente aumento da neurogênese e da neuritogênese, além de efeitos neuroprotetores contra danos neurotóxicos induzidos. Tais informações abrem novas perspectivas de investigação com relação a novas modalidades de tratamentos mais eficazes para pacientes com doenças neurodegenerativas, baseadas na indução de neurogênese e neuritogênese, por meio de estratégias em nível molecular.

Palavras-chave: Neurodiferenciação, doenças neurodegenerativas, alvos moleculares, via PI3K/AKT, neurogênese e neuritogênese, inibidores de acetilcolinesterase.