



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potencial neurotrófico e neuroprotetor do fitoquímico carvacrol
contra a neurotoxicidade induzida pela acroleína em células PC12**

Flávia Malvestio Sisti

**Ribeirão Preto
2021**

FLÁVIA MALVESTIO SISTI

**Potencial neurotrófico e neuroprotetor do fitoquímico carvacrol
contra a neurotoxicidade induzida pela acroleína em células PC12**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo
dos Santos**

Ribeirão Preto
2021

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.

Sisti, Flávia Malvestio

Potencial neurotrófico e neuroprotetor do fitoquímico carvacrol contra a neurotoxicidade induzida pela acroleína em células PC12. Ribeirão Preto, 2021.

123 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Santos, Antonio Cardozo dos.

1. Doenças neurodegenerativas. 2. Acroleína. 3. Atividade neurotrófica. 4. Neuritogênese. 5. Carvacrol. 6. Células PC12.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia Malvestio Sisti

Potencial neurotrófico e neuroprotetor do fitoquímico carvacrol contra a neurotoxicidade induzida pela acroleína em células PC12

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*À minha família, namorado e amigos,
por todo incentivo e compreensão
durante essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda proteção e bênçãos derramadas, por tornar tudo possível, por nunca me desamparar e sempre me dar forças para seguir em frente.

Aos meus pais Ana Lúcia e José Carlos e à minha irmã Giovana, por todo amor incondicional, paciência, cuidado e dedicação no dia a dia. Por dividirem comigo meus medos, angústias e também as conquistas. Sem vocês eu nada seria.

Aos meus avôs, tios, primos, namorado e amigos, por compreenderem minha ausência em tantos momentos, por sempre estarem ao meu lado, acreditando e torcendo por mim.

Ao meu orientador Prof. Antonio e à Neife, pela oportunidade, por terem me acolhido e ensinado tanto ao longo desses anos, por toda a paciência, confiança e auxílio que fizeram esse trabalho ser possível.

Às minhas companheiras de laboratório, por toda a amizade, ajuda e apoio diário, por dividirem comigo as angústias e dificuldades, mas, sobretudo, as conquistas e comemorações. Vocês foram essenciais para tornar tudo mais leve, nunca me esquecerei de vocês.

À todos os funcionários da USP que direta ou indiretamente me auxiliaram e contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo nº 140514/2018-0), por todo o apoio financeiro concedido.

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

*“Tudo tem seu apogeu e seu declínio...
É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece
convergir para o que supomos o nada,
eis que a vida ressurgue, triunfante e bela!
Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço!”*

Chico Xavier

RESUMO

SISTI, F. M. **Potencial neurotrófico e neuroprotetor do fitoquímico carvacrol contra a neurotoxicidade induzida pela acroleína em células PC12.** 2021. 123f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

As doenças neurodegenerativas afetam milhões de indivíduos mundialmente e são caracterizadas por progressiva degeneração, disfunção e morte de neurônios do Sistema Nervoso Central ou Periférico. Não há ainda tratamentos eficazes contra a neurodegeneração e o seu impacto nas funções cognitiva, motora e psíquica. O estresse oxidativo é um evento central na fase inicial das doenças neurodegenerativas e gera acúmulo de sub-produtos da peroxidação lipídica, sendo a acroleína o mais reativo dentre eles. A acroleína tem um papel significativo na perpetuação do estresse oxidativo e no desencadeamento da degeneração de axônios, dendritos e sinapses, que caracterizam a fase inicial das doenças neurodegenerativas e antecedem a morte dos neurônios. A perda da conectividade sináptica pode anteceder a morte neuronal por meses ou anos e é suficiente para causar disfunções cognitivas e motoras. Os fatores neurotróficos são cruciais para o restabelecimento da conectividade neuronal, sendo o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro e o Fator de Crescimento Neuronal as neurotrofinas mais afetadas na Doença de Alzheimer e na Doença de Parkinson. Devido às limitações das neurotrofinas para uso terapêutico, compostos naturais com atividade neurotrófica tem sido propostos como alternativas terapêuticas. O fitoquímico carvacrol possui atividade neuroprotetora que tem sido associada a seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios; porém, seus efeitos sobre a plasticidade axonal e sináptica e sobre o metabolismo energético, cujas alterações são fortemente relacionadas à neurodegeneração, ainda são desconhecidos. Assim, o presente estudo avaliou o envolvimento de mecanismos neurotróficos no efeito neuroprotetor do carvacrol em modelo neuronal com células PC12 tratadas com a neurotoxina acroleína, que exerce papel central na neurodegeneração. Os resultados demonstram a atividade neurotrófica do carvacrol através da ativação do receptor neurotrófico TrkA, seletivo para o Fator de Crescimento Neuronal, da ativação das vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/Akt, da indução de neuritogênese, da regulação positiva de proteínas associadas à plasticidade neuronal e sináptica (β -III tubulina, F-actina, neurofilamento de 200 kDa, GAP-43 e sinapsina 1) e da bioenergética (AMPK α e aumento da síntese de ATP). Adicionalmente, o carvacrol minimizou ou bloqueou efeitos inibitórios da acroleína na neuritogênese e na expressão da β -III tubulina, F-actina, neurofilamento de 200 kDa, GAP-43 e AMPK α . Em conjunto, esses resultados fornecem evidência de que o carvacrol ativa as mesmas vias e mimetiza muitos efeitos do Fator de Crescimento Neuronal, e pode ser benéfico no restabelecimento das conexões axonais e sinápticas perdidas nos estágios precoces da neurodegeneração. Estudos adicionais são necessários para melhor elucidação deste potencial.

Palavras-chave: doenças neurodegenerativas, acroleína, atividade neurotrófica, neuritogênese, carvacrol, células PC12.

ABSTRACT

SISTI, F. M. **The neurotrophic and neuroprotective potential of carvacrol against acrolein neurotoxicity in PC12 cells.** 2021. 123f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Neurodegenerative diseases affect millions of individuals worldwide and are characterized by progressive degeneration, dysfunction and death of neurons in the Central or Peripheral Nervous System. There are still no effective treatments against neurodegeneration and its impact on cognitive, motor and psychic functions. Oxidative stress is a central event in the initial phase of neurodegenerative diseases and generates an accumulation of by-products of lipid peroxidation, with acrolein being the most reactive among them. Acrolein plays a significant role in perpetuating oxidative stress and triggering the degeneration of axons, dendrites and synapses, which characterize the initial phase of neurodegenerative diseases and precedes neuron death. The loss of synaptic connectivity can precede neuronal death for months or years and is enough to cause cognitive and motor dysfunctions. Neurotrophic factors are crucial for the restoration of neuronal connectivity; Brain Derived Neurotrophic Factor and Neuronal Growth Factor the most affected neurotrophins in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. Due to the limitations of neurotrophins for therapeutic use, natural compounds with neurotrophic activity have been proposed as therapeutic alternatives. The phytochemical carvacrol has neuroprotective activity, which has been associated with its antioxidant and anti-inflammatory effects; however, its effects on axonal and synaptic plasticity and on energy metabolism, whose alterations are strongly related to neurodegeneration, are still unknown. The present study evaluated the involvement of neurotrophic mechanisms in the neuroprotective effect of carvacrol in a neuronal model with PC12 cells treated with the neurotoxin acrolein, which plays a central role in neurodegeneration. The results demonstrate the neurotrophic activity of carvacrol through activation of the neurotrophic receptor TrkA, selective for Neuronal Growth Factor, activation of the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways, stimulation of neurite outgrowth, upregulation of proteins associated with neuronal and synaptic plasticity (β -III tubulin, F-actin, neurofilament 200 kDa, GAP-43 and synapsin 1) and bioenergetics (AMPK α and increased ATP synthesis). Additionally, carvacrol minimized or blocked the inhibitory effects of acrolein on neuritogenesis and the expression of β -III tubulin, F-actin, neurofilament 200 kDa, GAP-43 and AMPK α . Taken together, these results provide evidence that carvacrol activates the same pathways and mimics many of the effects of Neuronal Growth Factor, and might be beneficial in restoring axonal and synaptic connections lost at the early stages of neurodegeneration. Further studies are needed to elucidate this potential.

Keywords: neurodegenerative diseases, acrolein, neurotrophic activity, neuritogenesis, carvacrol, PC12 cells.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Regiões cerebrais e células neuronais afetadas em diferentes DNs..... | 2 |
| Figura 2 – Estrutura química da ACR..... | 6 |
| Figura 3 – <i>Dying-back degeneration</i> | 8 |
| Figura 4 – Plasticidade e regeneração da célula neuronal..... | 10 |
| Figura 5 – Estrutura química do CAR..... | 14 |
| Figura 6 – Comparação entre a diferenciação de neurônios e de células PC12..... | 17 |
| Figura 7 – Componentes do citoesqueleto neuronal..... | 18 |
| Figura 8 – Efeito do CAR na viabilidade celular..... | 33 |
| Figura 9 – Indução de neuritogênese pelo CAR..... | 35 |
| Figura 10 – Efeito da inibição do receptor TrkA sobre a neuritogênese induzida pelo CAR..... | 39 |
| Figura 11 – Efeito da inibição da via MEK/ERK sobre a neuritogênese induzida pelo CAR..... | 40 |
| Figura 12 – Efeito da inibição da via PI3K/AKT sobre a neuritogênese induzida pelo CAR..... | 42 |
| Figura 13 – CAR não induz a biossíntese de NGF..... | 45 |
| Figura 14 – Ativação do receptor TrkA pelo CAR..... | 46 |
| Figura 15 – Aumento da expressão da β -III tubulina induzida pelo CAR..... | 48 |
| Figura 16 – Aumento da expressão da F-actina induzida pelo CAR..... | 49 |
| Figura 17 – Aumento da expressão do NF-200 induzida pelo CAR..... | 50 |
| Figura 18 – Aumento da expressão da GAP-43 induzida pelo CAR..... | 53 |
| Figura 19 – Aumento da expressão da sinapsina 1 induzida pelo CAR..... | 55 |
| Figura 20 – CAR não altera a expressão da sinaptofisina..... | 56 |
| Figura 21 – Aumento da expressão da AMPK α induzida pelo CAR..... | 59 |
| Figura 22 – Aumento da expressão da p-AMPK α induzida pelo CAR..... | 60 |
| Figura 23 – CAR não altera a expressão da SIRT 1..... | 61 |
| Figura 24 – CAR não altera a captação celular de glicose..... | 63 |
| Figura 25 – Biossíntese de ATP induzida pelo CAR..... | 64 |
| Figura 26 – Viabilidade de células PC12 expostas à ACR..... | 66 |
| Figura 27 – Redução da neuritogênese induzida pela ACR..... | 67 |
| Figura 28 – Efeito protetor do CAR contra a redução na neuritogênese induzida pela ACR..... | 69 |

| | |
|---|----|
| Figura 29 – Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da β -III tubulina induzida pela ACR | 70 |
| Figura 30 – Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da F-actina induzida pela ACR | 71 |
| Figura 31 – Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão do NF-200 induzida pela ACR | 72 |
| Figura 32 – Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da GAP-43 induzida pela ACR | 75 |
| Figura 33 – ACR e CAR não interferem na expressão da sinapsina 1..... | 77 |
| Figura 34 – ACR e CAR não interferem na expressão da sinaptofisina..... | 78 |
| Figura 35 – Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da AMPK α induzida pela ACR | 80 |
| Figura 36 – Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da p-AMPK α induzida pela ACR | 81 |
| Figura 37 – CAR não protege contra a redução da SIRT 1 induzida pela ACR..... | 82 |
| Figura 38 – ACR e CAR não alteram a captação de glicose..... | 84 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados no Western Blot..... | 29 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| DNs | Doenças neurodegenerativas |
| DA | Doença de Alzheimer |
| DP | Doença de Parkinson |
| DH | Doença de Huntington |
| ELA | Esclerose Lateral Amiotrófica |
| APP | Proteína precursora amilóide |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| ACR | Acroleína |
| BDNF | Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro |
| NGF | Fator de Crescimento Neuronal |
| Trk | Receptor de tirosina quinase |
| p75NTR | Receptor de neurotrofina p75 |
| AMPK | Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina |
| SIRT 1 | Sirtuína 1 |
| LKB1 | Quinase hepática B1 |
| CAR | Carvacrol |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| ERK | Quinase extracelular regulada |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3- quinase |
| Akt | Quinase específica de serina/treonina |
| GAP-43 | Proteína 43 associada ao crescimento |
| MTT | Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DO | Densidade ótica |
| GLUT | Transportador de glicose |
| NF-200 | Neurofilamento de 200 kDa |
| PBS | Solução salina tamponada |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| Resumo | i |
| Abstract | ii |
| Lista de figuras | iii |
| Lista de tabelas | v |
| Lista de abreviaturas e siglas | vi |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Doenças neurodegenerativas | 1 |
| 1.2 Estresse oxidativo e acroleína | 4 |
| 1.3 Neurodegeneração e neuroplasticidade cerebral | 8 |
| 1.4 Estratégia terapêutica contra as DNS..... | 13 |
| 1.5 Carvacrol | 14 |
| 1.6 Modelo <i>in vitro</i> com a linhagem de células PC12 | 16 |
| | |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| | |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 Reagentes..... | 22 |
| 3.2 Cultura celular | 23 |
| 3.3 Ensaio do MTT..... | 24 |
| 3.4 Ensaio de neuritogênese | 25 |
| 3.5 Quantificação de NGF por ELISA | 26 |
| 3.6 Análise da expressão de proteínas por Western Blot | 26 |
| 3.6.1 Obtenção do lisado celular..... | 27 |
| 3.6.2 Quantificação proteica..... | 27 |
| 3.6.3 Eletroforese em gel..... | 28 |
| 3.6.4 Transferência para membrana..... | 28 |
| 3.6.5 Reação com os anticorpos contra as proteínas-alvo..... | 29 |
| 3.7 Análise do NF-200 por imunofluorescência..... | 30 |
| 3.8 Análise da captação intracelular de glicose..... | 31 |
| 3.9 Quantificação de ATP..... | 32 |
| 3.10 Análise estatística | 32 |

| | |
|---|----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 4.1 Efeitos do CAR no modelo neuronal com células PC12 | 33 |
| 4.1.1 Efeito do CAR na viabilidade celular | 33 |
| 4.1.2 Efeitos do CAR na neurodiferenciação | 34 |
| 4.1.2.1 Efeito do CAR na neuritogênese | 34 |
| 4.1.2.2 Ativação do receptor TrkA e das vias PI3K/AKT e MEK/ERK na neuritogênese induzida pelo CAR | 38 |
| 4.1.2.3 Efeito do CAR sobre a expressão do NGF | 44 |
| 4.1.2.4 Efeito do CAR sobre a ativação do receptor TrkA..... | 45 |
| 4.1.2.5 Efeito do CAR sobre a expressão de proteínas do citoesqueleto | 47 |
| 4.1.2.6 Efeito do CAR na expressão da GAP-43 | 52 |
| 4.1.2.7 Efeito do CAR na expressão de proteínas associadas a vesículas sinápticas | 54 |
| 4.1.3 Efeitos do CAR na bioenergética celular | 58 |
| 4.2 Avaliação do potencial neuroprotetor do CAR contra a neurotoxicidade da ACR | 65 |
| 4.2.1 Ensaio de viabilidade celular | 65 |
| 4.2.2 Ensaios de neurodiferenciação | 67 |
| 4.2.2.1 Efeito da ACR sobre a neuritogênese induzida pelo NGF | 67 |
| 4.2.2.2 Proteção do CAR contra a redução da neuritogênese induzida pela ACR.... | 68 |
| 4.2.2.3 Proteção do CAR contra a redução na expressão das proteínas do citoesqueleto induzida pela ACR | 69 |
| 4.2.2.4 Proteção do CAR contra a redução na expressão da GAP-43 | 74 |
| 4.2.2.5 Efeito da ACR e do CAR na expressão de proteínas associadas a vesículas sinápticas | 76 |
| 4.2.3 Ensaios de bioenergética | 79 |
| 5. CONCLUSÃO | 86 |
| 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 87 |
| 7. REFERÊNCIAS | 88 |

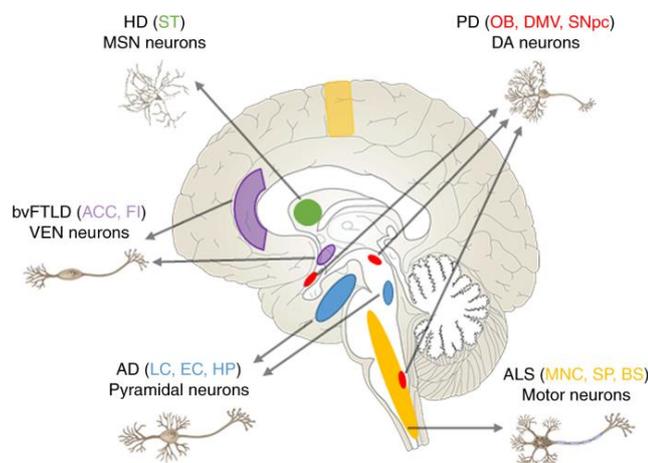
1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas (DNs) são caracterizadas por progressiva degeneração e disfunção de células neuronais do Sistema Nervoso Central e Periférico (KOVACS, 2017). As DNs mais prevalentes no mundo são a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP), Doença de Huntington (DH) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), sobretudo a DA e a DP (BOSSY-WETZEL; SCHWARZENBACHER; LIPTON, 2004). Em 2020, mais de 44 milhões de indivíduos foram diagnosticados com DA globalmente, enquanto o número de casos de DP foi de 10 milhões (COLLABORATORS, 2019). No Brasil, há poucos estudos epidemiológicos. Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer, o número estimado de brasileiros acometidos pela doença em 2019 era de 1,2 milhões; para a DP, as últimas estimativas apontavam 220 mil casos em 2016 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER, 2019; (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016).

Os sintomas clínicos e particularidades que diferenciam as principais DNs são reflexos sobretudo do tipo de células neuronais e das regiões cerebrais acometidas (figura 1), bem como das proteínas que sofrem alterações conformacionais e se acumulam nos ambientes intra e extracelulares (FU; HARDY; DUFF, 2018).

Figura 1- Regiões cerebrais e células neuronais afetadas em diferentes DNs



Legenda: Doença de Huntington (HD): neurônios GABAérgicos (MSN) na região do estriado (ST). Doença de Parkinson (PD): neurônios dopaminérgicos nas regiões do bulbo olfatório (OB), núcleo motor dorsal do vago (DMV) e substância negra pars compacta (SNpc). Degeneração Lobar Frontotemporal (FTLD): neurônios von ecônomo (VEM) na região do córtex cingulado anterior (ACC) e ínsula frontal (FI). Doença de Alzheimer (DA): neurônios piramidais nas regiões do lócus coeruleus (LC), hipocampo (HP) e córtex entorrinal (EC). Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS): neurônios motores no neocórtex motor (MNC), medula espinhal (SP) e tronco encefálico (BS). Fonte: adaptado de Fu; Hardy; Duff (2018).

Na DA por exemplo, as alterações histopatológicas clássicas são as placas β -amilóides no ambiente extracelular e os emaranhados neurofibrilares no interior dos neurônios. Os peptídeos β -amilóides são originados a partir da clivagem da proteína precursora amilóide (APP) pelas secretases β e γ em oligômeros que se agregam em fibrilas insolúveis e estas, posteriormente, se depositam em placas. A fosforilação exacerbada da proteína tau, associada aos microtúbulos do citoesqueleto, acarreta na sua dissociação e formação dos emaranhados neurofibrilares (NOORI et al., 2021). Os neurônios piramidais localizados na região do córtex e hipocampo, neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e neurônios noradrenérgicos do lócus ceruleus são os mais vulneráveis às alterações descritas, sendo que sua degeneração desencadeia déficits cognitivos como perda de memória, comunicação, dificuldade de aprendizado e demência, além de alterações comportamentais devido a alucinações, depressão e distúrbios de humor (2020 Alzheimer's disease facts and figures, 2020; CROUS-BOU et al., 2017; FU; HARDY; DUFF, 2018). No caso da DP, observa-se o acúmulo intracelular dos corpúsculos de Lewy formados por agregados da proteína sináptica α -sinucleína o que acarreta na degeneração de neurônios dopaminérgicos na região da substância negra, no núcleo motor dorsal do vago e bulbo olfativo, resultando em

disfunções motoras como rigidez muscular, bradicinesia (lentidão do movimento voluntário), tremores e instabilidade postural (JANKOVIC; TAN, 2020; NOORI et al., 2021). Contudo, conforme a neurodegeneração progride para demais regiões, tanto habilidades motoras quanto cognitivas, psíquicas e fisiológicas podem ser afetadas na DP e DNs de forma geral (ZHANG et al., 2016). Com isso, os indivíduos se tornam completamente debilitados e incapazes de realizarem tarefas simples do cotidiano, acarretando significativos prejuízos socioeconômicos e, em uma fase mais avançada, podem levar à morte (PETROVIC et al., 2020).

Além do acúmulo de agregados de proteínas anormais, as DNs também compartilham outras alterações a nível celular e molecular, sendo as principais: estresse oxidativo, inflamação, deficiência de fatores neurotróficos, disfunção mitocondrial e alterações no metabolismo energético (BOSSY-WETZEL; SCHWARZENBACHER; LIPTON, 2004; RANA et al., 2019). Isso sugere que mecanismos similares podem estar envolvidos na fisiopatologia dessas doenças (SALVADORES et al., 2017). Embora inúmeros estudos tenham sido desenvolvidos desde a descoberta das DNs, a etiologia e fisiopatologia dessas doenças ainda não foram completamente elucidadas. Apesar de uma parcela dos casos apresentar origem genética e hereditária, a esmagadora maioria possui causa idiopática. Nesses casos, observa-se que a idade constitui o principal fator de risco, sendo acometidos principalmente os indivíduos acima de 65 anos, o que explica a incidência crescente dos últimos anos paralelamente ao aumento da expectativa de vida da população mundial (BURKE; O'MALLEY, 2013; HOU et al., 2019b). Com o envelhecimento, o metabolismo das células neuronais sofre disfunções que as tornam mais suscetíveis aos danos responsáveis pelas principais alterações compartilhadas pelas DNs. A sequência temporal e relações causa-consequência entre essas alterações ainda são desconhecidas, porém, o mais provável é que cada uma, com seu potencial nocivo, acarrete em uma série de eventos que convergem em alterações irreversíveis e, por fim, na morte celular (JANKOVIC; TAN, 2020). Geralmente, os neurônios possuem capacidade adaptativa frente a essas alterações mas, em idosos, essa capacidade encontra-se comprometida (CASTELLI et al., 2019). A combinação dessa vulnerabilidade com predisposições genéticas, estilo de vida e exposição a contaminantes e poluentes ambientais é apontada como o fator desencadeador das DNs (COLLABORATORS, 2019).

Apesar dos incansáveis esforços para a descoberta de terapias eficazes contra essas doenças, ainda não há tratamento efetivo que evite ou reverta o quadro neurodegenerativo. As opções disponíveis na clínica são paliativas e aliviam os sintomas temporariamente, além de ocasionarem efeitos colaterais que comprometem a aderência ao tratamento (CUMMINGS et al., 2020; MCFARTHING et al., 2020). O grande desafio no desenvolvimento de agentes terapêuticos deve-se a fatores como: a agressividade do processo neurodegenerativo, complexidade do órgão afetado, diversidade de alterações em diferentes vias de sinalização, em proteínas e outros alvos moleculares, bem como a interação entre essas alterações, o que demanda agentes com múltiplas atividades (CRUZ-VICENTE et al., 2021). Considerando o aumento constante da expectativa de vida e o estilo de vida atual na maioria dos países, as DNs constituem um problema de saúde pública não somente da atualidade mas principalmente das próximas décadas. Assim, o maior entendimento sobre os mecanismos neurotóxicos e a descoberta de agentes neuroprotetores são cruciais para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para as DNs.

1.2 Estresse oxidativo e acroleína

Com o envelhecimento, ocorre um acúmulo progressivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o enfraquecimento das defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência de estresse oxidativo, evento central observado na fase inicial das DNs (SINGH et al., 2019). O cérebro contém elevada proporção de ácidos graxos poliinsaturados, que são sensíveis à lipoperoxidação, o que o torna particularmente vulnerável ao estresse oxidativo (HAMANN; SHI, 2009; YAMANAKA; YOSHIDA; DOI, 2008). Além disso, as células neuronais são ricas em mitocôndrias, que são ao mesmo tempo, alvos e geradoras de EROs. A alta demanda energética neuronal também contribui para a geração e o acúmulo de EROs a partir da fosforilação oxidativa durante a síntese de trifosfato de adenosina (ATP). Soma-se a isso, a deficiência de agentes antioxidantes como a catalase e glutathiona peroxidase (GOLPICH et al., 2017; HAMANN; SHI, 2009). Ao reagirem com moléculas de DNA, proteínas e lipídios, as EROS alteram suas conformações estruturais e funções e, conseqüentemente, ocasionam uma série de disfunções celulares. A peroxidação das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados pelas EROs libera fragmentos carbonílicos reativos como a acroleína (ACR), malonaldeído e 4-hidroxi-2-nonenal, que por sua

vez também promovem peroxidação e perpetuam os danos oxidativos às biomoléculas. A oxidação de lipídios constitui a principal causa de dano cerebral proveniente do estresse oxidativo pois seus produtos são altamente neurotóxicos e estão intimamente associados à patogênese das DNs (ANGELOVA; ESTERAS; ABRAMOV, 2021; PETROVIC et al., 2020). Dentre esses produtos, a ACR é o que apresenta maior meia vida (de 7 a 10 dias) e reatividade, sendo inclusive mais reativa do que algumas EROs como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; IGARASHI; UEMURA; KASHIWAGI, 2018).

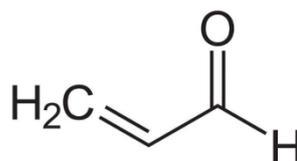
Além de condições de estresse oxidativo, a ACR também é gerada a partir do metabolismo fisiológico de aminoácidos como a treonina e metionina e de poliaminas como a espermina e espermidina (STEVENS; MAIER, 2008; UCHIDA et al., 1998; ZHANG et al., 2018). Somando-se à formação endógena, há ainda diversas fontes exógenas de geração da ACR, sendo as principais o meio ambiente (uso em herbicidas e biocidas, formação a partir da combustão incompleta de materiais plásticos, papéis, madeiras, combustíveis fósseis) e a alimentação (preparo de alimentos em altas temperaturas e por fermentação) (BURCHAM, 2017; ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; STEVENS; MAIER, 2008).

Embora os riscos da exposição exógena ainda sejam desconhecidos, ensaios experimentais em animais mostraram que o tratamento crônico com ACR por via oral interfere na atividade e coordenação locomotora, além de comprometer o desempenho de atividades cognitivas como aprendizado e formação de memórias, sugerindo que ela pode atingir o Sistema Nervoso Central e somar-se às concentrações formadas endogenamente (CHEN; JOSHI; MOCHLY-ROSEN, 2016; KHORAMJOUY et al., 2021). Sua constituição anfifílica e baixo peso molecular (56,06 g/mol) favorecem a difusão passiva através das membranas celulares e, embora sofra biotransformação, a ACR interfere em seu próprio metabolismo por meio da inibição das enzimas aldeído e álcool desidrogenases responsáveis por degradar o conjugado ACR-glutationa (IGARASHI; UEMURA; KASHIWAGI, 2020; MOGHE et al., 2015; NEGRE-SALVAYRE et al., 2008). Com o envelhecimento, as reservas de glutationa vão decaindo naturalmente e por não possuírem a aldeído desidrogenase, os neurônios se tornam mais suscetíveis ainda ao acúmulo de ACR (IGARASHI; UEMURA; KASHIWAGI, 2020; O'BRIEN; SIRAKI; SHANGARI, 2005). Nos indivíduos acometidos pela DA, a deficiência da enzima glutationa transferase interfere na

eliminação da ACR, além do metabolismo de poliaminas também encontrar-se elevado (DANG et al., 2010b; LOVELL; XIE; MARKESBERY, 1998). De fato, altas concentrações de ACR foram detectadas no cérebro de indivíduos com Declínio Cognitivo Moderado, com DA em estágio avançado e também na DP, ELA, Esclerose Múltipla e outros distúrbios neurológicos (SHAMOTO-NAGAI et al., 2007; TSOU et al., 2018; WEINHOLD, 2011; WILLIAMS et al., 2006).

Estudos sugerem que a ACR tem um papel significativo na perpetuação do estresse oxidativo e no desencadeamento da neurodegeneração (AMBAW et al., 2018; HO et al., 2020). Sua toxicidade está relacionada à proximidade do grupo carbonila que retira elétrons da ligação insaturada conferindo forte eletrofilicidade à sua molécula (figura 2) e, portanto, reatividade com moléculas nucleofílicas.

Figura 2- Estrutura química da ACR



Fonte: Shah et al. (2015).

Assim, reage facilmente com moléculas de DNA, lipídios e proteínas dando origem a adutos mais estáveis do que os formados por outros aldeídos e, em sua maioria, irreversíveis (BURCHAM, 2017; ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; LOPACHIN; BARBER; GAVIN, 2008). Ao originar adutos, a ACR interfere na composição, estrutural e funcionamento adequado das moléculas alvos, gerando estresse oxidativo e inflamação. Nas células neuronais especificamente, a ACR compromete a integridade da bainha de mielina e da membrana mitocondrial, afetando a transmissão do impulso elétrico e fornecimento apropriado de ATP; danifica a estrutura do citoesqueleto, degradando axônios e dendritos; modifica proteínas associadas a vesículas sinápticas reduzindo a liberação de neurotransmissores; favorece dano oxidativo às cadeias de DNA e a interrupção da expressão gênica; depleta glutathiona, reduz a defesa antioxidante e induz estresse oxidativo; altera sinalizações celulares e outros inúmeros processos que juntos provocam disfunção, degeneração e morte neuronal (LOPACHIN; BARBER; GAVIN, 2008a; LOPACHIN;

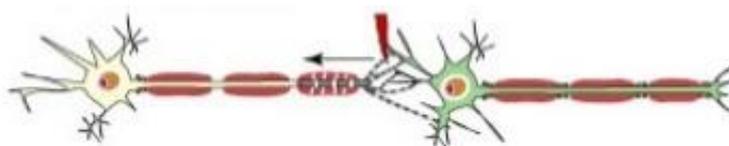
GEOHAGEN; NORDSTROEM, 2019; MOGHE et al., 2015; ZHU et al., 2011). A lipoperoxidação e consequente formação da ACR e do 4-hidroxi-2-nonenal estão envolvidos na sinaptotoxicidade do cérebro de pacientes com DA. Estudos indicam que a ACR e 4-hidroxi-2-nonenal podem causar danos nas terminações nervosas devido à formação de adutos com grupos sulfidrilas de proteínas pré-sinápticas (LOPACHIN; BARBER; GAVIN, 2008b). Em animais, foi observado que o tratamento com ACR resulta em atrofia da região do hipocampo, interferência nas atividades cognitivas e formação de memórias; recentemente, foi demonstrada uma correlação direta entre os níveis de ACR no fluido cérebro-espinhal e falha no aprendizado e memória em ratos (HUANG et al., 2013; KHORAMJOUY et al., 2021).

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado ainda que a ACR é capaz de induzir a formação e acúmulo dos principais achados histopatológicos clássicos da DA e DP. A ACR eleva os níveis dos peptídeos β -amilóides através do aumento dos níveis da proteína APP, da β -secretase (que cliva a APP em peptídeos), do transportador desses peptídeos da corrente sanguínea para o cérebro (transportador RAGE), além de reduzir a metaloproteínase ADAM-10 que evita a formação do fragmento β -amilóide. Adicionalmente, ao reagir com os peptídeos β -amilóides, impede o correto enovelamento e favorece a formação das placas amilóides (HUANG et al., 2013; SEIDLER; SQUIRE, 2005). A ACR também induz a hiperfosforilação da proteína tau e assim, a formação dos emaranhados neurofibrilares (CALINGASAN; UCHIDA; GIBSON, 1999; RASHEDINIA et al., 2015). Em relação à DP, a ACR induz a formação dos corpúsculos de Lewy ao atacar e modificar os resíduos de lisina da α -sinucleína, impedindo sua clivagem e promovendo sua agregação no interior de neurônios dopaminérgicos localizados na região da substância negra, achados estes que foram associados a déficits motores (AMBAW et al., 2018; SHAMOTO-NAGAI et al., 2007). Com base nesses achados, a detecção de adutos proteicos formados pela ACR foi sugerida como um biomarcador para as DNs (MIZOI et al., 2014; TSOU et al., 2018). Devido ao seu potencial neurotóxico e associação às DNs, estudos sobre os mecanismos de ação da ACR e possíveis agentes neuroprotetores que reduzam seus níveis ou protejam contra seus efeitos podem contribuir para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

1.3 Neurodegeneração e neuroplasticidade cerebral

Evidências provenientes de exames de imagens cerebrais e análise pós-morte do cérebro de pacientes acometidos por DNs revelaram que a degeneração de axônios e dendritos e disfunções sinápticas são eventos iniciais comuns entre essas doenças e que eles antecedem a morte dos neurônios (DING; HAMMARLUND, 2019; KRAUSS et al., 2020; SALVADORES et al., 2017). Estudos indicam que a degeneração se inicia na porção terminal do axônio e vai se propagando de maneira retrógrada (em inglês, *dying-back degeneration*) em direção ao corpo celular que eventualmente também sofre o processo degenerativo, como representado na figura 3 (SIFFRIN et al., 2010).

Figura 3- *Dying-back degeneration*



Fonte: Adaptado de Siffrin et al. (2010).

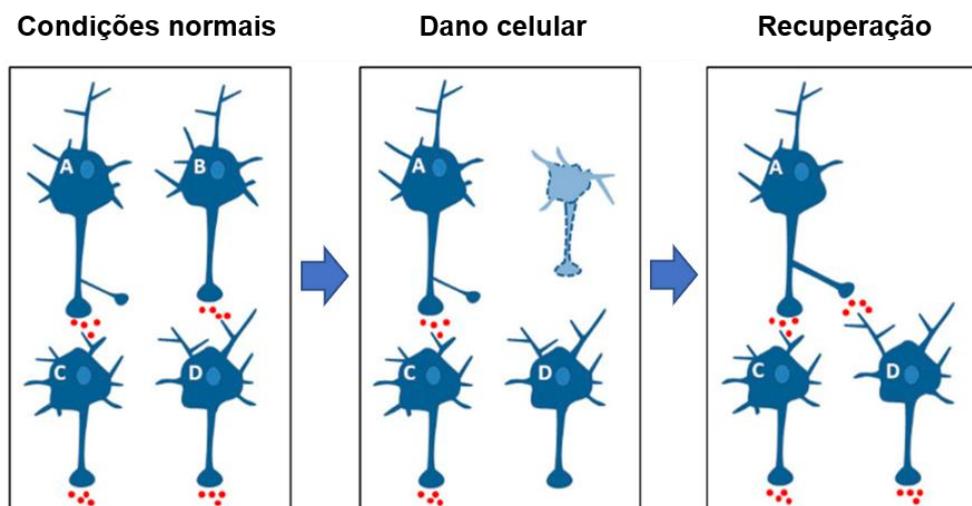
Danos estruturais e no funcionamento dos axônios comprometem o transporte de organelas, lipídeos, proteínas, vesículas e neurotransmissores para a região terminal bem como o retorno de sinais neurotróficos, proteínas e organelas danificadas para o corpo celular, ocasionando a quebra da homeostase e inviabilidade celular (MADAY et al., 2014). Conseqüentemente, ocorre também atrofia da árvore dendrítica da célula que estabelecia conexão com o terminal axonal danificado (CASTELLI et al., 2019).

A perda da conectividade entre as células pode anteceder a morte neuronal por meses ou até anos e parece ser suficiente para causar disfunções cognitivas e motoras (KRAUSS et al., 2020; PICCONI; PICCOLI; CALABRESI, 2012; TERRY, 2000). Na DP, por exemplo, os sintomas clínicos se desenvolvem após a maior parte da dopamina estriatal ter sido esgotada (70-80%), mas enquanto menos da metade dos neurônios dopaminérgicos da substância negra morreram. Isso sugere que os neurônios dopaminérgicos da substância negra sobrevivem até que uma proporção significativa dos respectivos axônios do estriado tenha degenerado (LOPACHIN;

BARBER; GAVIN, 2008). Alterações sutis em sinapses precedem também a formação dos aglomerados proteicos característicos da DA e contribuem para a progressão da degeneração e comprometimento da memória (MATSUI et al., 2012; SELKOE, 2002). Evidências crescentes indicam que a DA começa com alterações sutis da eficácia sináptica do hipocampo e que essas alterações tem maior correlação com a doença do que os achados histopatológicos, tanto em indivíduos vivos quanto após a morte (SELKOE, 2002). Como os neurônios necessitam de contato uns com os outros para manter-se vivos, uma vez que a conexão é perdida, salvar o corpo celular torna-se uma estratégia ineficaz (BURKE; O'MALLEY, 2013; GULYAEVA, 2017). De fato, opções terapêuticas direcionadas à manutenção do corpo celular e prevenção de apoptose não obtiveram sucesso na fase clínica (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2015; KRAUSS et al., 2020). Com isso, pesquisadores tem defendido que a regeneração dos prolongamentos axonais e dendríticos e a reintegração da célula lesionada à rede neuronal podem, além de prevenir os sintomas, evitar que a degeneração atinja o corpo celular e cause sua morte (BURKE; O'MALLEY, 2013).

O Sistema Nervoso possui a extraordinária habilidade de se adaptar tanto a estímulos fisiológicos quanto a alterações que afetam a estrutura e função de suas células (MATEOS-APARICIO; RODRÍGUEZ-MORENO, 2019). Graças à sua propriedade plástica, a célula neuronal é capaz de desfazer, refazer e fortalecer os filamentos de axônios, dendritos e conexões sinápticas, reorganizando toda a rede neuronal a fim de atender às novas condições exigidas e de manter as conexões necessárias para adequado funcionamento cerebral (CRAMER et al., 2011), como ilustrado na figura 4.

Figura 4- Plasticidade e regeneração da célula neuronal



Fonte: Adaptado de Bassi et al. (2019).

Contudo, nas DNs essa habilidade encontra-se comprometida, o que pode justificar a progressiva atrofia neuronal e sináptica (ENCIU et al., 2011; XU; LACOSKE; THEODORAKIS, 2014; YUAN et al., 2020). Um dos principais eventos envolvidos nesse processo é a deficiência de fatores neurotróficos (ANSARI; ROBERTS; SCHEFF, 2008). Por serem os mediadores centrais na regulação da sobrevivência, diferenciação e plasticidade neuronal, esses fatores são cruciais para o desenvolvimento, manutenção e regeneração do Sistema Nervoso (GORDON, 2009; HUANG; REICHARDT, 2001). Dentre eles, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (sigla em inglês, BDNF) e o Fator de Crescimento Neuronal (sigla em inglês, NGF) são os mais afetados na DA e DP e o baixo nível dessas neurotrofinas é observado logo na fase inicial das doenças, o que se acredita dar início a uma série de eventos que exacerbam a disfunção neurológica e a manifestação dos sintomas (ALLEN; WATSON; DAWBARN, 2011).

Os fatores neurotróficos agem através da interação com os receptores de tirosina quinase (Trk), pelos quais apresentam alta afinidade e especificidade, sendo que o NGF interage com o TrkA enquanto que o BDNF com o TrkB. Além dos Trks, eles também se ligam com menor afinidade ao receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), que por sua vez, induz eventos atrofícos como morte celular programada e inibição de processos neuroplásticos para a eliminação de neurônios inativos e de conexões neuronais não mais necessárias (XU; LACOSKE; THEODORAKIS, 2014). Quando os fatores neurotróficos estão em baixos níveis, a expressão do p75NTR se eleva e a

dos Trks se reduz, favorecendo a degeneração (MAJDAN et al., 2001). Além de promover efeitos atróficos, a ativação do p75NTR aumenta a expressão da enzima β -secretase o que contribui para a formação dos peptídeos β -amilóides na DA (SILVA et al., 2019). Por ser produzido na região do córtex e hipocampo e atuar na manutenção do fenótipo, função, sobrevivência e neuroplasticidade dos neurônios colinérgicos, o NGF está diretamente associado à DA e apresenta um papel fundamental no desempenho de funções cognitivas e formação de memórias (JOSEPHY-HERNANDEZ et al., 2019). A deficiência do NGF e o desequilíbrio de seus receptores podem ser algumas das alterações iniciais envolvidas na fisiopatologia da DA (STAMPANONI et al., 2019).

Além da deficiência dos fatores neurotróficos, disfunções no metabolismo energético e suprimento insuficiente de ATP também estão intimamente associados a falhas na neuroplasticidade, degeneração de sinapses, déficits cognitivos e morte neuronal (CUNNANE et al., 2020; NAVARRO; BOVERIS, 2004; ZILBERTER; ZILBERTER, 2017). Para sustentar a intensa síntese de proteínas e membranas, transporte intracelular de moléculas e organelas, remodelamento do citoesqueleto (CHENG; HOU; MATTSON, 2010; RAEFSKY; MATTSON, 2017), biossíntese, liberação e reciclagem de neurotransmissores, geração e restauração de potenciais de ação, manutenção do potencial de repouso e transmissão sináptica, as células neuronais necessitam de um elevado e contínuo fornecimento de ATP (LEUNER; SABIHI, 2016; MAINARDI; FUSCO; GRASSI, 2015; MARTORANA et al., 2018). Além disso, gastos energéticos também são direcionados para a eliminação de EROs, mediadores inflamatórios e proteínas tóxicas como os peptídeos β -amilóides ressaltando a importância da homeostase energética (VENKATESAN; JI; KIM, 2015).

Em condições normais, o principal substrato utilizado pelos neurônios para a produção de ATP é a glicose, que entra no ambiente intracelular através dos transportadores GLUT3 e passa pelo processo de glicólise no citosol, produzindo piruvato. Este em seguida dá início ao Ciclo do Ácido Cítrico na matriz mitocondrial liberando NADH e FADH₂ que são utilizados na etapa da fosforilação oxidativa (ZHOU et al., 2018). As mitocôndrias produzem ATP e regulam a homeostase de íons cálcio e de EROs, sendo elementos cruciais para a neuroplasticidade (CHENG; HOU; MATTSON, 2010; WANG et al., 2021), tanto que, durante a neurogênese e regeneração, seus níveis aumentam e sua distribuição acompanha as regiões de maior necessidade energética como os locais de brotamento de neuritos no corpo

celular, dendritos e axônios em crescimento, cone de crescimento axonal e terminais pré-sinápticos (JARA et al., 2019).

A alta demanda energética e a reduzida capacidade do cérebro em estocar energia o tornam extremamente vulnerável a oscilações nos níveis de glicose e ATP (VERGARA et al., 2019; ZHOU et al., 2018). Curiosamente, os neurônios das regiões cerebrais inicialmente afetadas nas DNs exigem um maior aporte de energia do que as demais células devido a maior complexidade estrutural que inclui densa arborização dendrítica e extensa rede de conexões sinápticas (MUDDAPU et al., 2020). Consequentemente, esses neurônios apresentam maior concentração de mitocôndrias e sofrem maior acúmulo de EROs provenientes da fosforilação oxidativa. Como a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados nessas organelas é alta, são susceptíveis à lipoperoxidação e formação de neurotoxinas como a ACR. Juntamente com as EROs, a ACR causa danos aos receptores GLUT, a enzimas cruciais para o metabolismo e ao DNA mitocondrial, o que reduz a captação de glicose, impede a expressão de novas proteínas e compromete a biossíntese de ATP, alterações estas observadas na fase inicial da DA, DP, DH e ELA (SAXENA, 2012; VERGARA et al., 2019; ZILBERTER; ZILBERTER, 2017). Somando-se a isso, fatores de risco comuns para essas doenças como o envelhecimento, hipoperfusão cerebral, neuroinflamação e resistência à insulina também contribuem para disfunções no metabolismo energético (NAKAGAWA et al., 1988; ZILBERTER; ZILBERTER, 2017).

Mecanismos que regulam a homeostase energética também se encontram suprimidos nas DNs, como ocorre com a via de sinalização AMPK/SIRT1 (DONG et al., 2016; JEŃSKO et al., 2017; SALMINEN; KAARNIRANTA, 2012). A AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina) é o principal sensor metabólico utilizado pelos neurônios para detectar oscilações no nível de ATP, sendo ativada quando a concentração de monofosfato de adenosina (AMP) se eleva e a de ATP decai. Para restaurar a homeostasia, essa quinase induz biogênese mitocondrial, aumento da captação intracelular de glicose, ativação das vias metabólicas que produzem ATP e reduz os processos que consomem energia como exemplo síntese de proteínas e de ácidos graxos (CETRULLO et al., 2015). Além de atuar na regulação do metabolismo energético, há evidências de que a ativação da AMPK reduz a formação de fragmentos β -amilóides por meio da inibição da β -secretase, estimula a autofagia dos fragmentos existentes, diminui a fosforilação da proteína tau e melhora a memória em modelos experimentais de DA em camundongos (GODOY et al., 2014;

WON et al., 2010). A AMPK também protege as células contra o envelhecimento gerado pelo estresse oxidativo através da indução de autofagia, processo essencial para a eliminação das proteínas tóxicas e mitocôndrias disfuncionais que se acumulam nas DNs e intensificam o estresse oxidativo (MAIESE, 2021). Adicionalmente, ao aumentar a concentração intracelular de NAD⁺, a AMPK estimula a atividade da sirtuína 1 (SIRT1), amplamente conhecida por promover longevidade e resistência ao estresse celular (CAMPOREZ et al., 2021; HAN et al., 2016).

Da mesma forma que a AMPK, a SIRT1 estimula a biogênese mitocondrial e o metabolismo de glicose, além de regular a expressão gênica e atividade proteica relacionadas a diversos processos como diferenciação, sobrevivência, apoptose, resposta ao estresse e envelhecimento; também tem sido associada à redução de mediadores inflamatórios e dos emaranhados neurofibrilares, ao aumento da resistência celular contra a toxicidade de fragmentos amilóides e proteção contra a degeneração axonal (ARAKI; SASAKI; MILBRANDT, 2004; CETRULLO et al., 2015; GUO et al., 2011; HOUTKOOOPER; PIRINEN; AUWERX, 2012). A SIRT1, por sua vez, também é capaz de ativar a AMPK por intermédio da quinase hepática B1 (LKB1) o que possibilita a ação coordenada dessas moléculas no metabolismo energético e demais alvos (RUDERMAN et al., 2010). Ambas, AMPK e SIRT 1, mostraram-se envolvidas na neuritogênese, diferenciação e regeneração neuronal e segundo estudos pré-clínicos, a regulação dos níveis de ATP foi capaz de desacelerar a neurodegeneração, o que ressalta a importância da homeostase energética para o fenômeno da neuroplasticidade (CUNNANE et al., 2020; GUO et al., 2011). Assim, acredita-se que o restabelecimento da homeostase energética em conjunto com efeitos pró-neurotróficos podem fornecer condições favoráveis para os neurônios combaterem estímulos nocivos e se regenerarem (ZILBERTER; ZILBERTER, 2017).

1.4 Estratégia terapêutica contra as DNs

Com base nas evidências que associam a deficiência dos fatores neurotróficos às DNs, a administração desses fatores foi sugerida como uma alternativa terapêutica, principalmente para a DA e DP (CASTRÉN; ANTILA, 2017; ROCCO et al., 2018). Contudo, apesar de toda a expectativa, ensaios clínicos revelaram limitações importantes da administração de neurotrofinas como agentes terapêuticos, tais como: baixa permeabilidade à barreira hematoencefálica, baixa

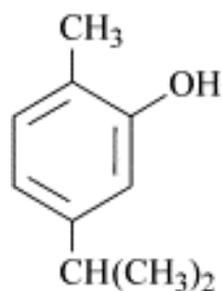
biodisponibilidade e estabilidade, pleiotrópicos (em diversos receptores), além do elevado custo de produção (BARTUS; JOHNSON, 2017; XU; LACOSKE; THEODORAKIS, 2014). Diante disso, pesquisadores passaram a sugerir o uso terapêutico de compostos que tivessem propriedades neurotróficas, mas com perfil farmacocinético favorável como uma possível alternativa para superar as limitações dos fatores neurotróficos endógenos. Diversos estudos tem sido realizados nos últimos anos para a descoberta ou biossíntese desses agentes (FUKUYAMA; KUBO; HARADA, 2020; JOSEPHY-HERNANDEZ et al., 2019; LONGO; MASSA, 2013).

Nesse cenário, substâncias naturais isoladas de plantas têm-se destacado não somente pela atividade neurotrófica mas também pela combinação de outras propriedades potencialmente neuroprotetoras como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica que as tornam candidatos promissores a agentes terapêuticos (ABD RASHED; ABD RAHMAN; RATHI, 2021; BAGLI et al., 2016; VENKATESAN; JI; KIM, 2015; XU; LACOSKE; THEODORAKIS, 2014).

1.5 Carvacrol

Dentre o vasto universo dos compostos fitoquímicos, o carvacrol (CAR) é o principal constituinte do óleo essencial de plantas aromáticas da família Lamiaceae cujo os representantes mais conhecidos são o orégano (*Origanum vulgare*) e o tomilho (*Thymus vulgaris*) (BASER, 2008). Quimicamente, é classificado como um monoterpeno fenólico (5-isopropil-2metilfenol, figura 5), estrutura que lhe garante diversas propriedades biológicas e farmacológicas (AZIZI et al., 2020).

Figura 5- Estrutura química do CAR



Fonte: Vincenzi et al. (2004).

Além disso, CAR apresenta propriedades físico-químicas e farmacocinéticas favoráveis ao desenvolvimento de um medicamento (“drug-likeness”), é potencialmente capaz de atravessar a Barreira Hematoencefálica e agir no Sistema Nervoso Central (ELHADY et al., 2019; JAVED et al., 2020). Em razão das atividades bactericida, fungicida, inseticida, aromatizante e flavorizante, tem sido amplamente utilizado como um aditivo e conservante nas indústrias alimentícia e cosmética, sendo considerado relativamente seguro para consumo humano pela agência regulatória de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration), além de constar na lista dos flavorizantes permitidos pelo Conselho da Europa (DE VINCENZI et al., 2004; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

Ao longo dos anos, diversos estudos vêm revelando também um vasto potencial farmacológico do CAR que inclui atividades anti-inflamatória, antioxidante, ansiolítica, antidepressiva e neuroprotetora, que o tornam um potencial candidato a agente terapêutico para as DNs (BASER, 2008; SHAHROKHI RAEINI et al., 2020; ZOTTI et al., 2013). Em modelo animal de Hipoperfusão Cerebral Crônica, fenômeno comum entre as DNs, Raeini e colaboradores observaram que a administração de CAR atenuou o processo de necrose neuronal e déficit cognitivo, ao mesmo tempo em que elevou os níveis de catalase e superóxido dismutase e reduziu o marcador de estresse oxidativo malondialdeído (SHAHROKHI RAEINI et al., 2020). De acordo com outros estudos, CAR também é capaz de reduzir o processo de apoptose neuronal através da redução da ativação da caspase-3 (KHALIL et al., 2017; YU et al., 2012). Mais especificamente em relação à DA, o estudo desenvolvido por Azizi e colaboradores mostrou que o CAR ameniza o déficit cognitivo de animais em estado de demência induzido pelo peptídeo β -amilóide e por escopolamina (AZIZI et al., 2012). Recentemente, esse mesmo grupo de pesquisadores observou o efeito protetor do CARV contra alterações citotóxicas induzidas pelo peptídeo β -amilóide em células PC12 (AZIZI et al., 2020). Além disso, CAR inibe a atividade da enzima acetilcolinesterase, mecanismo dos agentes terapêuticos atualmente utilizados no tratamento da DA para elevar os níveis de acetilcolina e melhorar as funções cognitivas (JUKIC et al., 2007; KAUFMANN; DOGRA; WINK, 2011). Resultados promissores também foram obtidos em modelos da DP induzidos com reserpina ou 6-hidroxidopamina, nos quais CAR protegeu os neurônios dopaminérgicos da região do corpo estriado contra a degeneração, normalizou os níveis de dopamina e melhorou as atividades locomotoras dos animais, o que foi associado à redução de estresse

oxidativo (LINS et al., 2018; MANOUCHEHRABADI et al., 2020). CAR também modula a liberação de neurotransmissores dos sistemas GABAérgico, dopaminérgico e serotoninérgico o que pode amenizar as alterações neuropsíquicas relacionadas ao humor e ao comportamento também presentes nos indivíduos acometidos pelas DNS (DELGADO-MARÍN; SÁNCHEZ-BORZONE; GARCÍA, 2017; MELO et al., 2011; ZOTTI et al., 2013).

De maneira geral, a capacidade neuroproteora do CAR tem sido atribuída às atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiapoptótica e anticolinesterásica (GUAN et al., 2019; MOHAMMEDI, 2017). Porém, os efeitos neurotróficos e sobre a bioenergética do CAR ainda não foram estudados. Tais efeitos seriam essenciais para a regeneração da conectividade neuronal. A modulação desses processos pelo CAR ainda é desconhecida, assim como seu potencial protetor contra a toxina ACR, gerada nos processos de estresse oxidativo.

1.6 Modelo *in vitro* com a linhagem de células PC12

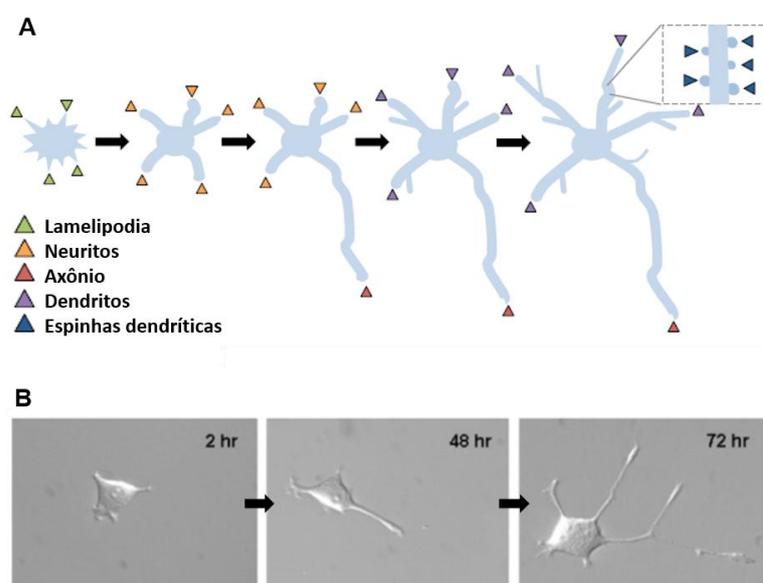
Um modelo neuronal amplamente utilizado no estudo de agentes neurotróficos e neuroprotetores é a linhagem de células PC12, derivadas do feocromocitoma de ratos, um tumor que se desenvolve nas células cromafins da porção medular das glândulas adrenais (GREENE; TISCHLER, 1976; WIATRAK et al., 2020). Devido à sua origem embrionária proveniente da crista neural, as células PC12 expressam o receptor TrkA, seletivo para a neurotrofina NGF, e podem facilmente se diferenciar em células semelhantes a neurônios (CALABRESE, 2008; COLANGELO et al., 2019; HUANG; REICHARDT, 2001). Quando expostas ao NGF, ocorre a dimerização do receptor TrkA seguida pela autofosforilação dos seus resíduos de tirosina e, por conseguinte, ativação das cascatas intracelulares moduladas pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK/ERK) e pela fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt). Essas quinases induzem a expressão de genes envolvidos na sobrevivência, diferenciação e plasticidade, promovendo alterações morfológicas e funcionais (LIU; WANG; LU, 2015; VAUDRY et al., 2002).

Essa linhagem apresenta significativas vantagens como modelo neuronal *in vitro* o que justifica sua ampla utilização em neurociência. Em comparação a culturas primárias de neurônios por exemplo, as PC12 não necessitam do NGF para sobrevivência, o que possibilita seu uso como controle negativo sem tratamento para

os ensaios experimentais. Também pelo fato de não terem sido previamente expostas ao NGF *in vivo* como ocorre com as culturas primárias, não sofrem alterações em suas respostas quando expostas novamente ao fator nos ensaios *in vitro* (CALABRESE, 2008). Além disso, expressam diversas proteínas neurotípicas, são facilmente cultiváveis, muito versáteis a manipulações farmacológicas e a vários cultivos mantendo reprodutibilidade nos experimentos (WESTERINK; EWING, 2008). O grande número de estudos com essa linhagem celular e o conhecimento decorrente acumulado dão importante suporte aos achados relacionados à neurotoxicidade, neuroproteção, neurosecreção, neuroinflamação e sinaptogênese (WIATRAC et al., 2020).

A diferenciação das células PC12 ocorre de maneira muito similar a das células precursoras de neurônios (WATSON et al., 2012). Ambas se iniciam com a germinação e crescimento de filamentos cilíndricos denominados de neuritos que apresentam no mínimo o tamanho do diâmetro do corpo celular. Posteriormente, durante a diferenciação neuronal, um desses prolongamentos é selecionado para dar origem ao axônio e os demais se desenvolvem em dendritos, conforme ilustrado na figura 6 (BENNISON et al., 2020; DA SILVA; DOTTI, 2002; KESSELS et al., 2011).

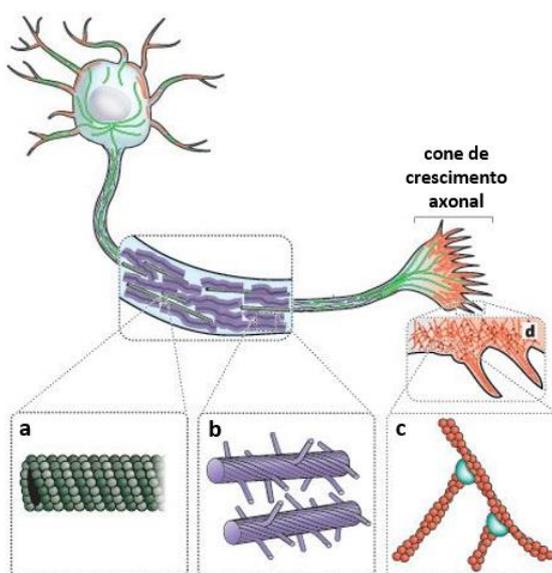
Figura 6- Comparação entre a diferenciação de neurônios e células PC12



Legenda: (A) representação das diferentes fases de desenvolvimento de um neurônio. Fonte: adaptado de Bae (2012). (B) Célula PC12 se diferenciando após 2, 48 e 72 horas de estímulo com NGF 100 ng/mL. Fonte: adaptado de Radio e Mundy (2008).

Os neuritos são necessários não apenas para a formação inicial dos axônios e dendritos mas também durante a regeneração destes que ocorre a partir de um neurito pré-formado (MELDOLESI, 2011). Para que a neuritogênese seja possível, são necessários o acúmulo e a interação coordenada entre os componentes do citoesqueleto, que apresentam composições proteicas variadas e tamanho diferentes (figura 7) o que possibilita o desempenho de diferentes funções (LEWIS; COURCHET; POLLEUX, 2013; MURPHY et al., 1993).

Figura 7- Componentes do citoesqueleto neuronal



Legenda: (a) microtúbulos; (b) neurofilamentos; (c) filamentos de actina pela; (d) região do cone de crescimento axonal com filamentos de actina formando lamelipodias. Fonte: adaptado de Fletcher e Mullins (2010).

Os microfilamentos formados pela proteína actina na forma filamentosa (F-actina) são os menores constituintes do citoesqueleto (5 a 7 ηm) e apresentam assim bastante flexibilidade. Seu acúmulo e reorganização em determinada região periférica do corpo celular formam protusões chamadas de lamelipodia. Nos neurônios em desenvolvimento, as lamelipodias compõem as regiões do cone de crescimento das espículas dendríticas e dos axônios e, devido à elevada motilidade e concentração de receptores, respondem a estímulos presentes no microambiente. Assim, desempenham importante papel em guiar o crescimento axonal em direção ao local apropriado para as sinapses, estabelecendo conexões eficientes durante o desenvolvimento e regeneração (KAWASAKI et al., 2018). A interação dos filamentos de actina com os microtúbulos vai aumentando a extensão das filopodias até formação

dos neuritos. Os microtúbulos são formados por dímeros de α - e β - tubulinas e são os maiores e mais rígidos componentes do citoesqueleto (20 a 25 μm), responsáveis por fornecer sustentação à estrutura celular e aos extensos axônios, estando também envolvidos no transporte intracelular em associação a proteínas motoras/carreadoras. Ao mesmo tempo em que os microtúbulos e filamentos de actina vão interagindo entre si, os neurofilamentos (polímeros de tamanho intermediário constituídos por subunidades proteicas de 68 kDa, 160 kDa e 200 kDa), vão se acumulando e preenchendo o interior dos neuritos em desenvolvimento. Esses neurofilamentos são essenciais para a manutenção da forma celular, aumento do calibre axonal e condução do impulso nervoso, além de também possibilitarem o transporte de biomoléculas entre o corpo celular e as terminações nervosas (FLYNN, 2013; LEWIS; COURCHET; POLLEUX, 2013; SAINATH; GALLO, 2015).

Outra proteína também expressa pelas células PC12 e diretamente envolvida na formação dos neuritos é a proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43) (PERERA et al., 2019). Essa proteína está associada à membrana celular e concentra-se na região do cone de crescimento onde promove a polimerização da actina em filamentos e, posteriormente, regula a dinâmica e estabilização destes. A GAP-43 ainda regula a exocitose, endocitose e reciclagem dos neurotransmissores ao interagir com proteínas das vesículas sinápticas (DENNY, 2006; HOLAHAN, 2017). Por ser expressa somente em células neuronais, é amplamente utilizada como um biomarcador da neurodiferenciação (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004).

Quando diferenciadas, as células PC12 ainda são capazes de expressar proteínas que participam da sinaptogênese e de formar sinapses funcionais com elas mesmas e também com outras linhagens, inclusive células neuronais (CLIFT-O'GRADY et al., 1990; JEON et al., 2010). Suas vesículas sinápticas são análogas às vesículas encontradas no cérebro de ratos e apresentam a mesma origem, tamanho, densidade e composição proteica (CLIFT-O'GRADY et al., 1990). A principal proteína encontrada nas vesículas das células PC12 é a sinaptofisina, essencial para a fusão das vesículas com a membrana plasmática e exocitose dos neurotransmissores (BECHER et al., 1999; GREENGARD et al., 1993). Por ser especificamente localizada na fenda sináptica, é amplamente utilizadas para quantificação de sinapses (CALHOUN et al., 1996). As PC12 também expressam a família das sinapsinas, principais proteínas sinápticas presentes nas vesículas neuronais (MIRZA; ZAHID, 2018; TAO-CHENG et al., 1995). As sinapsinas localizam-se na parte externa da

membrana vesicular e ao associarem aos filamentos de actina do citoesqueleto, regulam a mobilidade e disponibilidade das vesículas para as sinapses. Na forma ativa (fosforilada), as sinapsinas deixam de interagir com o citoesqueleto e as vesículas tornam-se livres para rolamento pelo terminal axonal e posterior fusão e liberação dos neurotransmissores para a fenda, estando assim, intimamente envolvidas com a plasticidade sináptica (GREENGARD et al., 1993; MIRZA; ZAHID, 2018).

Assim, a diferenciação das células PC12 pode ser avaliada tanto através da análise morfológica de neuritos quanto pela expressão de proteínas neurotípicas, sendo ferramentas amplamente empregadas na prospecção de agentes neurotróficos e neuroprotetores e para o estudo dos mecanismos moleculares de neurotoxicidade e neuroproteção (CHAURASIYA; SHUKLA; TEKWANI, 2017; CHO; TIFFANY-CASTIGLIONI, 2004; MITCHELL et al., 2007).

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade neurotrófica e neuroprotetora do CAR contra a neurotoxicidade da ACR em modelo neuronal com as células PC12. Para tal propósito, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- indução de neuritogênese e o envolvimento do receptor TrkA e das cascatas de sinalização PI3K/Akt e MEK/ERK, com o uso de inibidores farmacológicos dessas vias;

- biossíntese de NGF;

- ativação (fosforilação) do receptor TrkA;

- expressão das proteínas associadas à plasticidade axonal e sináptica: β -III tubulina, F-actina, NF-200, GAP-43, sinapsina 1 e sinaptofisina;

- expressão das proteínas reguladoras do metabolismo bioenergético AMPK α e SIRT1;

- captação celular de glicose e biossíntese de ATP;

- proteção contra os efeitos inibitórios da ACR na neuritogênese, na expressão das proteínas associadas à plasticidade axonal e sináptica, na bioenergética e na captação celular de glicose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A ACR, os anticorpos anti-AMPK α , anti-p-AMPK α , anti- β -actina, anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG, anti-SIRT1, o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), CAR, colágeno tipo IV, coquetel inibidor de proteases e fosfatases, dimetilsulfóxido (DMSO), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com e sem fenol, Fator de crescimento neuronal (NGF) da *Vibora lebetina*, Fator de crescimento neuronal 7S (NGF-7S) da glândula submaxilar de camundongos, K252a, LY294002, poli-L-lisina, albumina de soro bovino (BSA), soro fetal bovino, solução de tripsina, U0126 e o corante Hoeschst 33342 foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Os meios de cultura F-12 Nutrient Mixture Kaighn's Modification (F-12K) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sem glicose, soro equino e a solução de antibióticos (5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina) foram obtidos da GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA. A glicose marcada com radionuclídeo (³H), o líquido de cintilação Ultima Gold™ e a solução de lise celular SOLVABLE™ foram obtidos da PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA). Os anticorpos anti- β III-tubulina, anti-GAP-43, anti-F-actina, anti-mouse IgM, anti-NF-200, anti-rabbit IgG conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, anti-sinapsina 1 e anti-sinaptofisina foram obtidos da Abcam® (MA, USA), enquanto que o anti-p-TrkA Tyr490 foi da Thermo Fisher Scientific (MA, USA). Os reagentes e equipamentos necessários para o Western Blot (tampões, leite desnatado, membranas, géis, marcador, cuba, etc) foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories® (Hercules, CA, USA). A água Milli-Q utilizada foi obtida em sistema de purificação Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, USA).

As soluções de CAR foram preparadas a partir de uma diluição primária em DMSO e diluições posteriores em solução de salina tamponada com fosfato (PBS) 1x. As soluções de ACR foram preparadas água Milli-Q.

3.2 Cultura celular

Os ensaios foram realizados com células da linhagem PC12 adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, CRL-1721™). Para descongelamento das células mantidas em tanque de nitrogênio, foi utilizada uma pipeta de *Pasteur* descartável para transferência do conteúdo do tubo de congelamento para um frasco do tipo Falcon® contendo 5 mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado com 10% de soro equino, 5% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (DMEM completo). Em seguida, o frasco foi submetido à centrifugação a 2.000 rpm por 2 minutos, o conteúdo líquido foi descartado e o *pellet* celular foi dissolvido em 1 mL de DMEM completo. Então uma alíquota foi utilizada para a contagem do número aproximado de células em Câmara de Neubauer, bem como para a determinação da porcentagem de célula viáveis através do teste de exclusão com Azul de Tripán 0,4%. Células com viabilidade superior a 80% foram cultivadas em garrafas com superfície de 25 cm² (1x10⁶ a 4x10⁶ células) ou 75 cm² (5x10⁶ a 25x10⁶ células), com o meio de cultura DMEM completo e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ (Thermo Scientific® Forma Water Jacketed CO₂ Incubator). O meio de cultura foi renovado a cada dois dias, até as células atingirem 80% de confluência. Para a coleta destas, tanto para expansão celular quanto para realização dos ensaios, o meio de cultura foi descartado e a garrafa foi lavada uma vez com tampão fosfato-salino (PBS) 1x antes da adição de tripsina 1x (2 mL para a garrafa de 25 cm² ou 5mL para a de 75 cm²), sob a qual as células ficaram expostas de 3 a 5 minutos dentro da atmosfera da incubadora para eliminar a adesão celular à garrafa. A solução de tripsina foi inativada com a diluição em DMEM completo e a suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o *pellet* celular foi dissolvido em 1 mL de meio de cultura apropriado para cada experimento e as células foram contadas em Câmara de Neubauer para obtenção da densidade específica de cada ensaio. Células de segunda ou terceira passagem foram usadas nos ensaios.

3.3 Ensaio do MTT

A viabilidade das células expostas ao CAR ou à ACR foi determinada através do ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) conforme descrito por Hansen com pequenas modificações. Este ensaio é amplamente utilizado pela comunidade científica como ensaio preliminar para avaliar a viabilidade celular após exposição a determinado agente químico (AMINZADEH; SALARINEJAD, 2021; GOLLO et al., 2020). Seu princípio baseia-se na funcionalidade de desidrogenases encontradas principalmente em mitocôndrias e retículo endoplasmático de células viáveis, que ao reduzirem o sal de tetrazólio MTT, dão origem aos cristais de formazan. Estes por sua vez, após serem solubilizados possibilitam uma alteração na coloração (de amarela para púrpura) e quantificação por espectrometria (MOSMANN, 1983).

Para isso, as células foram semeadas em placa de 96 poços revestidas com poli-L-lisina, 2×10^4 células/ poço em 200 μ L de DMEM sem fenol suplementado com 10% de soro equino, 5% de soro bovino e 1% de solução de antibióticos, mantidas em incubadora por 24 horas para adesão. Após este período, foi realizado o tratamento com CAR (12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 600 e 800 μ M) ou ACR (6, 10, 15, 22, 33, 50, 75 e 112 μ M) em nove replicatas. Também foi realizado um controle negativo sem tratamento e um positivo para a morte celular com Tritox X-100 0,2%. Após 72 horas de tratamento, 20 μ l de MTT 5 mg/mL foi adicionado às células. Seguidas 3 horas de incubação, o sobrenadante foi desprezado, 200 μ L de DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan formados pelas células viáveis, a placa foi agitada por 10 minutos a 37°C e a absorbância foi determinada a 570 nm, em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific). Por fim, a porcentagem de células viáveis foi calculada em razão da média da absorbância obtida no grupo controle de células sem tratamento (considerada 100%) e plotadas em gráfico de barras.

3.4 Ensaio de neuritogênese

A metodologia desse ensaio foi baseada nos estudos de (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004; UDOMRUK et al., 2020). As células foram cultivadas em placa de 24 poços revestidas com colágeno IV, 2×10^5 células por poço em 300 μL de DMEM, suplementado com 10% de soro equino, 5% de soro bovino e 1% de solução de antibióticos, e mantidas em incubadora por 24 horas para adesão. Após este período, o meio foi substituído pelo F-12K suplementado com 1% de soro equino e 1% de solução de antibióticos e as células foram submetidas aos seguintes tratamentos por 72 horas.

Para a determinação do efeito do CAR sobre a neuritogênese, concentrações de 1,5 a 400 μM foram obtidas através de diluições seriadas a partir da concentração de 400 μM obtendo-se 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,2 μM , 3,1 μM e 1,5 μM . Também foram realizados grupos controle do veículo de dissolução do CAR (DMSO 0,02%, maior concentração presente no ensaio), controle positivo para a formação de neuritos (NGF 100 ng/mL) e controle negativo sem tratamento. Após constatação da atividade neuritogênica do CAR ($EC_{50} = 12,5 \mu\text{M}$), foi investigado se receptor TrkA e as vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/Akt estariam envolvidos no mecanismo. Com base nos estudos de Phan et al. (2014) e Seow et al. (2017), agentes inibidores do TrkA (K252a 100 ng/mL), da PI3K (LY294002 50 μM) e MAPK (U0126 10 μM) foram expostos às células 1 hora antes do tratamento com CAR 12,5 μM ou NGF 100 ng/mL (controle positivo). Os compostos LY294002 e U0126 foram diluídos em DMSO 1% e o K252a em PBS 1x, conforme indicado pelo fabricante. Em adição, também foram realizados grupos de células tratadas somente com os inibidores ou com o veículo de diluição DMSO 0,1% (concentração final no poço).

Para avaliar o possível efeito nocivo da ACR sobre a neuritogênese, as células foram tratadas simultaneamente com NGF 100 ng/mL e várias concentrações de ACR (15 μM , 10 μM , 6 μM , 4 μM , 3 μM e 2 μM) também obtidas através de diluições seriadas, e o grupo controle foi realizado apenas com NGF 100 ng/mL . Após a análise desses resultados, para avaliar o efeito protetor do CAR contra a redução da neuritogênese gerada pela ACR, as células foram tratadas com NGF 100 ng/mL , ACR 6 μM e CAR 12,5 μM , sendo o controle realizado com NGF.

Finalizadas as 72 horas dos tratamentos descritos acima $\eta\text{g/mL}$, imagens de 4 campos por poço foram obtidas por microscópio óptico invertido com contraste de fase (Zeiss) em aumento de 400x. Posteriormente, o tamanho do diâmetro dos corpos celulares e o comprimento dos prolongamentos foram medidos com o programa Image J Open Source Software (RASBAND; WS, 1997-2015), sendo considerado como neurito os prolongamentos com comprimento igual ou superior ao diâmetro da célula. O resultado final foi expresso em porcentagem de células com neuritos. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos ao menos três vezes.

3.5 Quantificação do NGF por ELISA

A indução de biossíntese do NGF pelo CAR foi determinada através do ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Para isso, as células foram plaqueadas nas mesmas condições descritas na seção 3.4. Após 24 horas de adesão celular, o meio foi substituído pelo F-12K suplementado com 1% de soro equino e 1% de solução de antibióticos e as células foram tratadas por 72 horas com carvacrol nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 μM . Após esse período, alíquotas de 100 μL do meio de cultura (sobrenadante) foram analisadas através do kit DY556 (R&D systems ®) seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi determinada a 450 nm em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

3.6 Análise da expressão de proteínas por Western Blot

A expressão das proteínas receptor TrkA fosforilado no resíduo de tirosina 490 (p-TrkA), β -III tubulina, F-actina, GAP-43, sinapsina 1, sinaptofisina, AMPK α , AMPK α fosforilada (p-AMPK α) e SIRT1 foram determinadas através da técnica de Western Blot de acordo com as etapas abaixo.

3.6.1 Obtenção do lisado celular

As células foram plaqueadas como descrito na seção 3.4 e após 24 horas, o meio foi substituído pelo F-12K suplementado com 1% de soro equino e 1% de solução de antibióticos e as substâncias foram adicionadas como descrito a seguir. Para analisar o efeito do CAR na expressão dessas proteínas, foram realizados grupos de células sem tratamento (controle), com CAR 12,5 μM e outro com CAR 50 μM . Para análise da ativação do receptor TrkA (p-TrkA), um grupo controle positivo com NGF 100 ng/mL foi incluído e o período de tratamento foi de 24 horas com base em resultado preliminar no qual esse período resultou em maior efeito pelo NGF em comparação a 20 minutos e 72 horas. Já o período de tratamento para as demais proteínas foi de 72 horas de acordo com o melhor período para estudo da diferenciação celular. Para avaliar a redução pela ACR na expressão dessas proteínas induzidas pelo NGF e a proteção desse efeito pelo CAR, foi utilizado o NGF-7S 100 ng/mL com base em resultados preliminares mais satisfatórios. Foi realizado um grupo controle com o NGF-7S 100 ng/mL , outro grupo de células com NGF-7S 100 ng/mL em conjunto com ACR 6 μM e outro com NGF-7S 100 ng/mL na presença de ACR 6 μM e CAR 50 μM .

Após finalizados os períodos de tratamentos, o meio de cultura dos poços foi descartado, as placas foram mantidas sobre gelo e 40 μL do tampão de lise *CellLytic™* acrescido de coquetel inibidor de protease (1:200) e inibidor de fosfatase a 1% foi adicionado por poço. Após 10 minutos, as células foram removidas dos poços com o auxílio de um raspador, transferidas para microtubos e centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 min a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram armazenados em novos microtubos, sendo uma alíquota de 10 μL separada para quantificação de proteína. Os lisados celulares foram armazenados em freezer a -80°C até a realização da eletroforese.

3.6.2 Quantificação proteica

A concentração de proteínas nos lisados foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A curva de calibração foi preparada com albumina de soro bovino (BSA) em água Milli-Q nas concentrações de 40, 80, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Os lisados foram diluídos 5x em água Milli-Q assim como o reativo de cor utilizado

Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad®) e o tampão de lise. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 10 µL das soluções de BSA ou de lisado ou de tampão de lise em 190 µL do reagente de cor em quadruplicatas. Posteriormente, a placa foi agitada por 10 segundos a 300 rpm e a leitura da absorbância foi determinada a 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific). A média das absorbâncias do grupo controle realizado com o tampão de lise para eliminar sua interferência na leitura foi subtraída nas médias dos valores das absorbâncias das amostras e a concentração foi calculada de acordo com a equação da reta obtida da curva de calibração, multiplicada em seguida pelo fator de diluição (x5).

3.6.3 Eletroforese em gel

Para a etapa da eletroforese, as concentrações proteicas das amostras foram igualadas à menor concentração obtida em cada ensaio através de diluição com tampão de lise e o volume equivalente a 15 µg de proteína foi calculado. Posteriormente, foi adicionado o tampão de carregamento Laemli 4x contendo 10% de β-mercaptoetanol na proporção de 1:4 nas amostras e estas foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) com densidade gradiente de 4 a 20% para o anticorpo p-TrkA ou de 10% para as demais proteínas e separadas por eletroforese a 160 Volts por 1 hora em cuba eletroforética contendo 1 litro de tampão TRIS/glicina/SDS 1x.

3.6.4 Transferência para membrana

As proteínas foram então transferidas do gel para membrana de nitrocelulose em suporte contendo esponjas e papéis de filtro em cuba eletroforética com 1 litro do tampão de transferência (100 mL do tampão TRIS/Glicina 10x + 200mL de metanol + 700mL de água Milli-Q) por 1 hora a 0,37 Amperes. Finalizada a transferência, as membranas foram incubadas com o tampão de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em solução de TTBS 1x (TBS + 0,1% de Tween 20) por 4 horas, a 300 rpm e 4°C, antes das reações com os anticorpos.

3.6.5 Reação com os anticorpos contra as proteínas-alvo

As membranas foram incubadas *overnight*, a 300 rpm e 4°C com os seguintes anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio:

Tabela 1- Anticorpos primários utilizados no Western Blot

| ANTICORPO PRIMÁRIO | HOSPEDEIRO | DILUIÇÃO |
|-----------------------------------|------------|----------|
| anti-AMPK α (IgG) | coelho | 1:200 |
| anti-p-AMPK α (IgG) | coelho | 1:200 |
| anti- β -actina (IgG) | camundongo | 1:3000 |
| anti- β -III tubulina (IgG) | coelho | 1:1000 |
| anti-F-actina (IgM) | camundongo | 1:100 |
| anti-GAP-43 (IgG) | camundongo | 1:1250 |
| anti-sinapsina 1 (IgG) | coelho | 1:1000 |
| anti-sinaptofisina (IgG) | camundongo | 1:400 |
| anti-SIRT1 (IgG) | coelho | 1:200 |
| anti-p-TrkA (IgG) | coelho | 1:250 |

Posteriormente, elas foram lavadas 3x com TTBS 1x por 10 minutos à temperatura ambiente e 300 rpm e, incubadas com o anticorpo secundário adequado (anti-rabbit IgG ou anti-mouse IgG ou anti-mouse IgM, conjugados com a enzima horseradish peroxidase e diluídos em tampão de bloqueio na proporção de 1:6000) por 1 hora, à temperatura ambiente e 300 rpm. Em seguida, foram lavadas 2x com TTBS 1x e 1x com TBS 1x durante 10 minutos (temperatura ambiente e 300 rpm). Por fim, as membranas foram protegidas da luz e expostas às soluções do kit ECL (Clarity, Bio-Rad®) na proporção de 1:1 para revelação por quimioluminescência em fotodocumentador (ChemiDoc Bio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA). Após digitalização das membranas, a densidade ótica das bandas foi quantificada com o software Image Lab (versão 5.2.1, Bio-Rad®). Entre a incubação com anticorpos diferentes, as membranas foram lavadas 2x com o tampão de *stripping* (1,5% de glicina + 0,1% de SDS + 1% de Tween 20 a pH 2,2) por 10 minutos, à temperatura ambiente e 300 rpm, incubadas novamente com o tampão de bloqueio por 1 hora antes da adição do anticorpo. A proteína β -actina foi utilizada como controle de carregamento com base no estudo de (L'EPISCOPO et al., 2011) de tal forma que os

valores das densidades óticas das proteínas de interesse foram divididos pelos valores das densidades obtidas com a β -actina.

3.7 Análise do NF-200 por imunofluorescência

O neurofilamento de 200 kDa (NF-200) foi determinado através da técnica de imunocitoquímica por fluorescência com base no estudo de Schimmelpfeng, Weibezahn e Dertinger (2004) com algumas modificações (SCHIMMELPFENG; WEIBEZAHN; DERTINGER, 2004). As células foram cultivadas em placa de 12 poços (2×10^5 células por poço) sobre lamínulas revestidas com colágeno IV (1 lamínula por poço), em 600 μ L de DMEM acrescido de 10% de soro equino, 5% de soro bovino e 1% de solução de antibióticos por 24 horas para adesão celular. Posteriormente, o meio foi substituído pelo F-12K suplementado com 1% de soro equino e 1% de solução de antibióticos e as células foram submetidas a tratamentos em triplicatas por 72 horas com CAR 12,5 μ M ou CAR 50 μ M. Para análise da proteção do fitoquímico contra a ACR, foram realizados grupos com NGF-7S 100 η /mL (controle), NGF-7S 100 η /mL + ACR 6 μ M e NGF-7S 100 η /mL + ACR 6 μ M + CAR 50 μ M. Após as 72 horas de incubação, o meio foi removido dos poços e as células foram fixadas nas lamínulas com 500 μ L de paraformaldeído 4% em PBS 1x por 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com 500 μ L de PBS 1x e as células foram permeabilizadas com 400 μ L de PBS 1x contendo 0,2% de triton X-100 por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada uma nova lavagem com 500 μ L de PBS 1x e incubação por 1 hora com a solução de bloqueio (3% de BSA em PBS 1x, acrescido de 0,1% de Tween 20) antes da incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo anti-NF-200, diluído 1:500 em PBS 1x contendo 1% de BSA. Depois, as células foram lavadas 2x com 500 μ L de PBS 1x e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1:500 em PBS 1x com 1% de BSA, por 1 hora a temperatura ambiente e protegidas da luz. Então 2 lavagens foram feitas com 500 μ L de PBS 1x antes da incubação com 20 μ M do corante nuclear Hoechst 33342 por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram transferidas para lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência (Olimpus BX51, aumento de 400x) utilizando filtros específicos para o NF-200 (filtro 2) e para o núcleo celular (filtro 1). Imagens aleatórias foram obtidas com o software Standard Cell Sense e a fluorescência foi quantificada com o software Image J (RASBAND,

1997-2014). A fluorescência emitida pelas células coradas com o NF-200 foi obtida pela fórmula: densidade integrada da imagem – (área da imagem X média da fluorescência emitida por 3 regiões sem células (*backgrounds*)). Por fim, as imagens do NF-200 e dos núcleos foram sobrepostas para melhor visualização.

3.8 Análise da captação celular de glicose

As células foram cultivadas em placas de 6 poços revestidos com poli-L-lisina, 1×10^6 células por poço contendo 1 mL de DMEM suplementado com 10% de soro equino, 5% de soro bovino e 1% de solução de antibióticos por 24 horas para adesão. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de DMEM com 1% de soro equino, 1% de soro bovino e 1% de solução de antibióticos e as células foram tratadas por 72 horas com CAR 12,5 μM , CAR 50 μM , ACR 6 μM ou ACR 6 μM + CAR 12,5 μM e um grupo de células sem tratamento foi realizado para controle negativo. Finalizado o tempo de tratamento com as substâncias, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados 3x com 1 mL de PBS 1x e em seguida foi adicionado 1 mL de DMEM sem glicose. Um controle positivo para a redução da captação de glicose foi realizado com a citocalasina B 10 μM por 1 hora. Posteriormente, foram adicionadas às células soluções equimolares (50 μM) de Deoxi-D-glicose e de Deoxi-D-glicose marcada com radionuclídeo trício (2-[1,2- ^3H (N)]; 1.0 μCi). Após 30 minutos a 37°C, o meio de cultura foi descartado, foram realizadas 3 lavagens com 1 mL de PBS 1x e 200 μL de solução de lise celular SOLVABLE™ foi adicionado em cada poço. Após 5 minutos, foi adicionado 1 mL de líquido de cintilação, as placas foram agitadas por 5 minutos para homogeneização e o conteúdo foi transferido para tubos cônicos de 1,5 mL. A radioatividade foi mensurada em um detector de cintilação Microbeta 1450 LSC Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA) e os resultados foram expressos em contagens por minuto. Todo o protocolo foi realizado com base no estudo de Muneer et al. (2011).

3.9 Quantificação de ATP

As células foram cultivadas em placas de 24 poços revestidos com poli-L-lisina, 2×10^5 células por poço em 300 μL de DMEM suplementado com 10% de soro equino, 5% de soro bovino e 1% de solução de antibióticos por 24 horas para adesão. Após este período, o meio foi substituído pelo F-12K suplementado com 1% de soro equino e 1% de mix de antibióticos e as células foram tratadas com CAR 12,5 μM ou 50 μM por 72 horas. Um grupo de células foi mantido sem tratamento para controle negativo. Em seguida, seguindo as instruções do fabricante, a quantidade de ATP intracelular foi determinada pelo método de luminescência através do kit *Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit (FLASC)* da Sigma-Aldrich®. As leituras foram realizadas em luminômetro GBerthold modelo TriStar² S LB 942.

3.10 Análise estatística

Foram realizados pelo menos três ensaios independentes e em cada ensaio as amostras foram avaliadas em triplicatas. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism 5® (San Diego, California, USA) empregando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

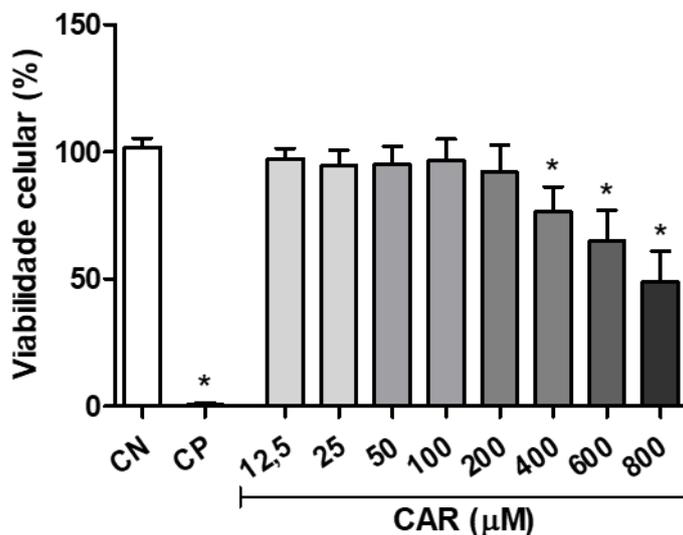
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos do CAR no modelo neuronal com células PC12

4.1.1 Efeitos do CAR na viabilidade celular

Foi analisado se tratamento com CAR por 72 horas (melhor período para estudo da diferenciação celular), afetaria a viabilidade celular. Para isso, foi selecionado um amplo intervalo de concentrações (12,5 a 800 μM). Nas concentrações de 12,5 a 200 μM , o CAR não alterou a viabilidade em relação ao grupo de células não tratadas ($101,8 \pm 3,66\%$). Só foi observada citotoxicidade a partir de 400 μM ($76,38 \pm 9,99\%$), com diminuição progressiva da porcentagem de células viáveis em resposta ao aumento da concentração, atingindo uma redução de 52,81% com 800 μM ($48,89 \pm 12,23\%$). O triton X-100 (0,2%) foi utilizado como controle positivo de citotoxicidade e aboliu completamente a viabilidade das células ($0,70 \pm 0,78\%$) (figura 8).

Figura 8- Efeito do CAR na viabilidade celular



Legenda: Porcentagens de células PC12 viáveis determinadas através do método do MTT após 72 horas de tratamento com diversas concentrações de CAR (12,5 μM a 800 μM). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em nove replicatas e expressos como média \pm desvio padrão. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (CN). CP: controle positivo (triton X-100 0,2%); CAR: carvacrol (μM).

Em linha com nosso resultado, no estudo realizado por Azizi e colaboradores em 2020, nas concentrações de 1 a 200 μM , o CAR não interferiu na viabilidade das células PC12 após 48 horas de tratamento, sendo esta reduzida 20% com CAR 500 μM (AZIZI et al., 2020). No nosso estudo, observamos uma redução aproximada (25%) com uma concentração inferior (400 μM), provavelmente devido ao maior período de exposição (72h *versus* 48h) das células ao fitoquímico. Em cultura primária com neurônios isolados do hipocampo de ratos, o CAR mostrou-se menos citotóxico do que em células PC12, visto que reduziu significativamente a viabilidade apenas a partir da concentração de 1 mM, também analisada pelo ensaio do MTT após 48 horas de tratamento (WANG et al., 2017).

A partir desse resultado, selecionamos para o ensaio de neuritogênese as concentrações que não interferiram na viabilidade celular (12,5 a 200 μM). Foram inseridas também algumas concentrações inferiores a 12,5 μM bem como a concentração de 400 μM , que apesar de reduzir a viabilidade em 25,4%, foi incluída para possibilitar melhor compreensão do efeito do CAR sobre a neuritogênese.

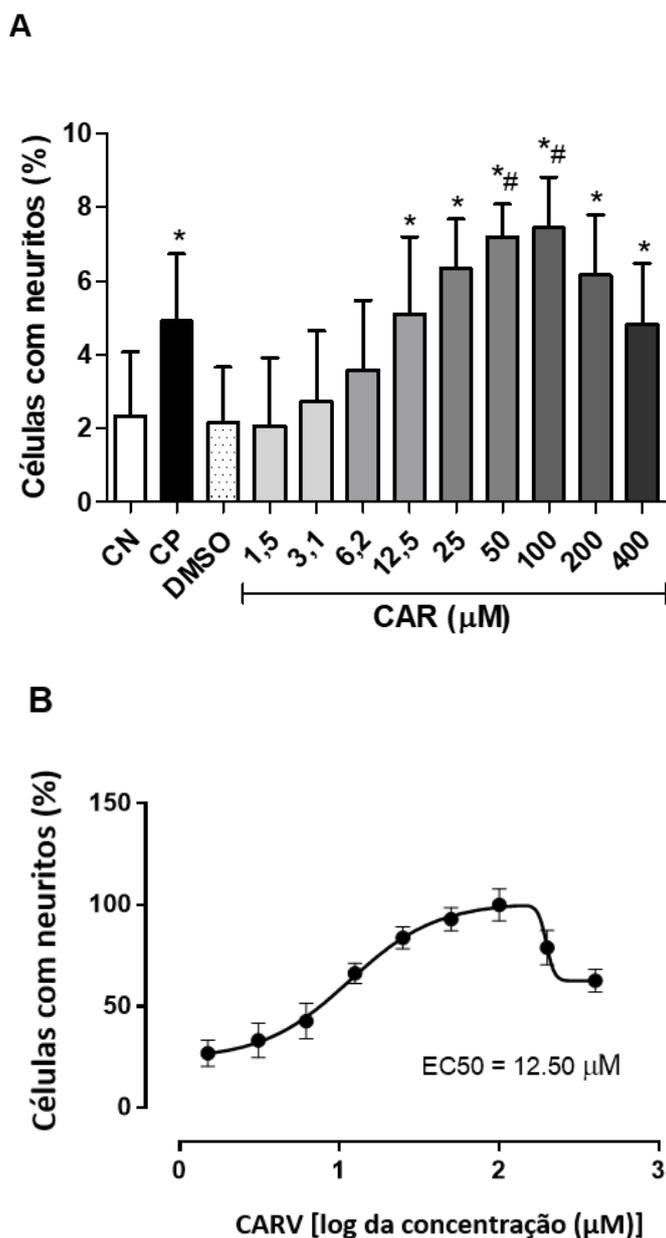
4.1.2 Efeitos do CAR na neurodiferenciação

4.1.2.1 Efeito do CAR na neuritogênese

A análise das fotomicrografias retiradas das células após 72 horas de tratamento revelou que a exposição ao CAR 1,5 μM ($2,07 \pm 1,85$ %) e ao DMSO 0,02% (veículo de dissolução do CAR) ($2,15 \pm 1,50$ %) não ocasionaram alterações morfológicas em comparação ao grupo de células que não recebeu tratamento (controle negativo, $2,31 \pm 1,76$ %). A partir da concentração de 3,1 μM , o CAR induziu a formação de neuritos de maneira dependente da concentração, atingindo níveis estatisticamente significativos a partir de 12,5 μM . O tratamento das células com CAR 12,5 μM elevou significativamente a porcentagem de células com neuritos ($5,09 \pm 2,09$ %) em relação ao controle negativo ($2,31 \pm 1,76$ %), efeito semelhante ao induzido pelo controle positivo NGF ($4,91 \pm 1,82$ %), enquanto que CAR 25 μM , 50 μM e 100 μM induziram $6,33 \pm 1,33$ %, $7,19 \pm 0,88$ % e $7,44 \pm 1,37$ %, respectivamente. Em contrapartida, acima de 100 μM , o CAR gerou efeito negativo sobre a neuritogênese visto que a porcentagem de células com neuritos decaiu de maneira progressiva com o aumento da concentração, chegando a $6,16 \pm 1,63$ % com CAR 200 μM e $4,82 \pm$

1,66 % com CAR 400 μM , embora ainda estatisticamente significativo em relação ao controle sem tratamento (figura 9).

Figura 9- Indução de neuritogênese pelo CAR



Legenda: (A) Porcentagens de células PC12 com neuritos após 72 horas de tratamento com: NGF 100 ng/mL (controle positivo, CP); DMSO: dimetilsulfóxido 0,02% (veículo de dissolução); CAR: carvacrol 1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 μM . Células sem tratamento foram usadas como controle negativo (CN). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média \pm desvio padrão. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN. # Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CP. (B) Curva concentração-resposta (regressão não linear) da porcentagem de células com neuritos *versus* log das concentrações de CAR. O maior valor médio foi normalizado para 100% ($\text{EC}_{50} = 12,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$).

O gráfico da porcentagem de células com neuritos *versus* o log das concentrações de CAR revelou que CAR 12,5 μ M induziu neuritogênese em 50% das células (EC_{50}) e foi selecionada como concentração de trabalho para os demais ensaios. Ao contrário do CAR, que apresentou atividade neuritogênica por si só, outros fitoquímicos requerem o tratamento sinérgico com o NGF em baixa concentração como é o caso da artepelina C isolada da resina da *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como própolis verde (KANO et al., 2008). Uma das hipóteses é a de que os compostos neurotróficos que tem efeito sinérgico ou aditivo ao NGF agem estabilizando os homodímeros pré-formados pela ação do NGF nos receptores trkA, induzindo alterações conformacionais, não sendo capazes de induzir por si só a formação dos homodímeros (MALIARTCHOUK et al., 2000). Diferentemente, no nosso estudo, o CAR promoveu a neuritogênese em células privadas de NGF e, portanto, por mecanismo independente do estímulo neurotrófico do NGF.

Analisando a atividade neuritogênica do CAR observamos o perfil bifásico em formato de sino (“bell-shaped”) no qual o efeito aumenta em função do aumento da concentração até um limite e então começa a diminuir com o aumento da concentração. Assim, nota-se uma primeira fase benéfica e positiva na indução de neuritogênese e uma segunda fase caracterizada por progressivo declínio nesse processo, compatível com o fenômeno de hormese. Alguns fitoquímicos são horméticos ao promoverem benefícios em baixas concentrações e efeitos nocivos se usados em grande quantidade, o que também ajuda a explicar o efeito observado na viabilidade celular, apresentado na figura 8 (JODYNIS-LIEBERT; KUJAWSKA, 2020; MURUGAIYAH; MATTSON, 2015).

De fato, o perfil de resposta bell-shaped é comum entre compostos que detêm atividade neurotrófica, tanto endógenos como o BDNF e NGF quanto exógenos, incluindo agentes fitoquímicos como o resveratrol (CALABRESE, 2008; RENAUD; MARTINOLI, 2019). Estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa também mostraram esse mesmo perfil na neuritogênese induzida pelo peptídeo p-BTX-I (Glu-Val-Trp) isolado da serpente *Bothrops atrox* e pelo antibiótico doxiciclina (AMARAL et al., 2021; BERNARDES et al., 2018). O mecanismo pelo qual concentrações elevadas interferem na neuritogênese ainda não foi elucidado e os estudos realizados até o momento são contraditórios. Os fatores neurotróficos ativam os receptores Trk e p75NTR que apresentam efeitos opostos sobre a diferenciação

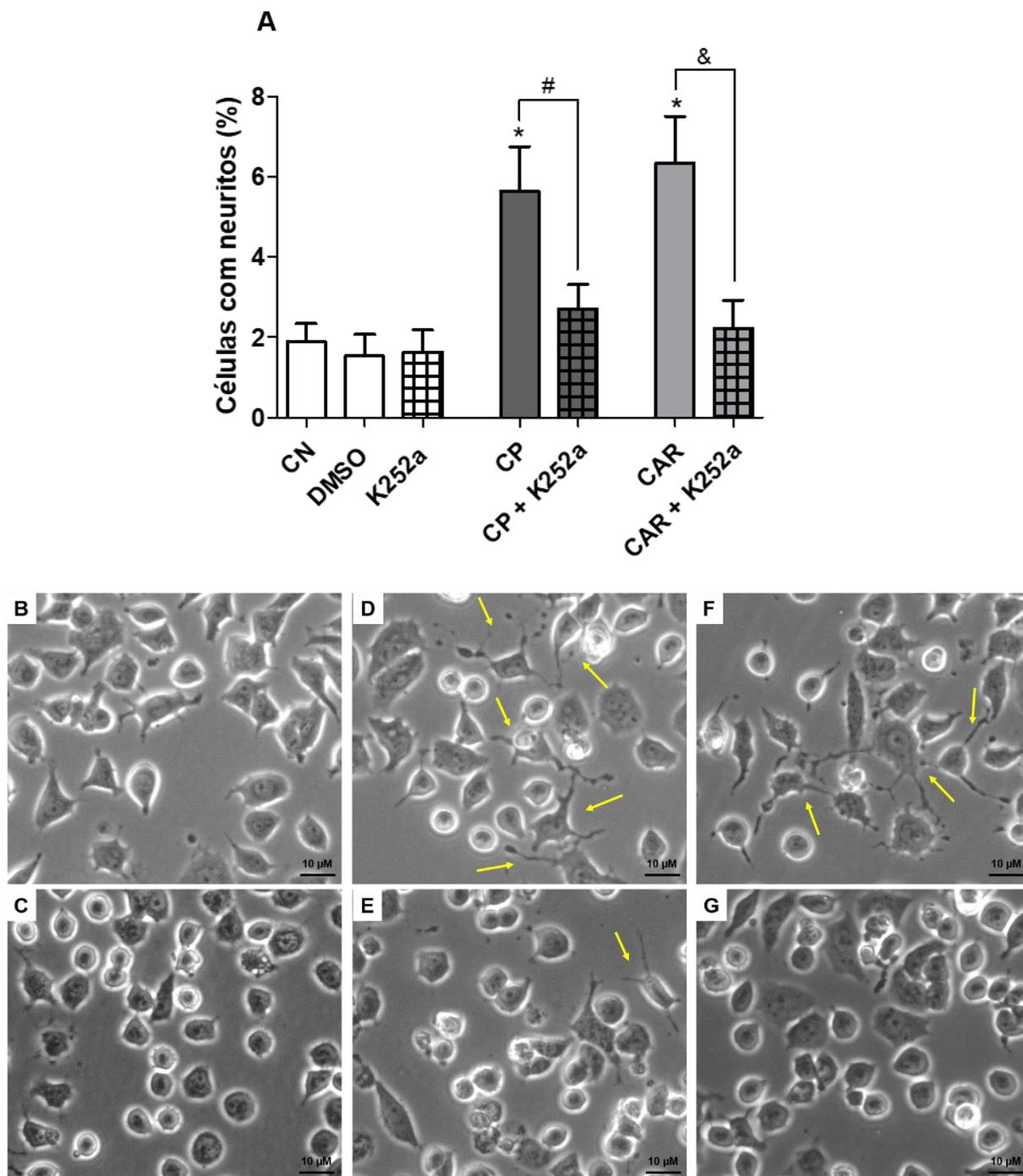
neuronal. Em altas concentrações, pode ocorrer saturação do receptor de alta afinidade Trk e consequente aumento da interação com o receptor p75NTR, o que inibe neuritogênese e diferenciação (KEMP et al., 2011). No entanto, Conti et al. (2004) propuseram que a inibição da neuritogênese ocasionada por elevadas concentrações de NGF em neurônios isolados do gânglio da raiz dorsal de camundongos resultou da internalização do TrkA da membrana plasmática para o citoplasma e foi independente da interação com o receptor p75NTR (CONTI et al., 2004). Por outro lado, Calabrese (2008) observou que concentrações altas de BDNF inibem a neuritogênese através da ativação do receptor p75NTR.

Estudos indicam que compostos capazes de induzir neuritogênese *in vitro*, possuem atividade neurotrófica e potencial de promover a regeneração de axônios e dendritos *in vivo* (MELDOLESI, 2011; MITCHELL et al., 2007). Foi observado que o CAR aumenta o número e o comprimento de neuritos em cultura primária de neurônios isolados do hipocampo de ratos (BAE, 2012). O efeito observado também apresentou perfil “bell-shaped”, sendo que a concentração de 200 μ M foi a mais efetiva e a partir dela, o comprimento dos neuritos foi reduzindo com o aumento da concentração. Contudo, o referido estudo não investigou o envolvimento de receptores e vias neurotróficas e atribuiu o efeito observado à inibição do Receptor de Potencial Transiente de Melastatina tipo 7 (TRPM7) (BAE, 2012). O TRPM7 é um canal iônico não-seletivo, permeável a cálcio, ativado pelo estiramento da membrana durante a formação e crescimento de neuritos, o que aumenta o influxo celular desse íon. Níveis adequados de cálcio são essenciais para a neuritogênese pois regulam a fusão de vesículas, formação de membranas, polimerização e dinâmica do citoesqueleto; seu excesso causa inibição do crescimento e retração dos neuritos. Ao inibir esse canal, o CAR regula a concentração iônica de cálcio no ambiente intracelular e favorece a neuritogênese (PARNAS et al., 2009). Curiosamente, o receptor TrkA e o canal TRPM7 estão associados entre si. Ao ativar o receptor TrkA, o NGF inibe o canal TRPM7 (JIANG et al., 2008; TIAN et al., 2007). É possível que o CAR atue pelo mesmo mecanismo uma vez que, de acordo com nossos dados, o CAR ativa o receptor TrkA (resultado apresentado nas figuras 10 e 14).

4.1.2.2 Ativação do receptor TrkA e das vias PI3K/AKT e MEK/ERK na neuritogênese induzida pelo CAR

O envolvimento do TrkA foi avaliado inibindo-se farmacologicamente a fosforilação dos seus resíduos de tirosina com o composto K252a, durante uma hora antes do tratamento com CAR 12,5 μ M (concentração que induz 50% de neuritogênese). O mesmo procedimento foi empregado no grupo tratado com NGF (controle positivo). A inibição farmacológica do TrkA pelo K252a interferiu de maneira significativa na formação de neuritos induzida pelo CAR, reduzindo de $6,33 \pm 1,16$ % no grupo CAR para $2,22 \pm 0,70$ % no grupo CAR + K252a, o que corresponde a uma redução de 65%. Efeito semelhante foi observado no grupo NGF + K252a, que apresentou redução de 52% da neuritogênese em relação ao grupo NGF (de $5,63 \pm 1,1$ % para $2,71 \pm 0,60$ %). O composto K252a ($1,62 \pm 0,55$ %) por si só bem como o solvente DMSO na concentração de 0,1% ($1,53 \pm 0,53$ %) não alteraram significativamente a porcentagem de células com neuritos ($1,88 \pm 0,44$ %) em relação ao controle não tratado (figura 10 A, B e C). Nas fotomicrografias (figura 10 D - G), observa-se a redução do percentual de células com neuritos nos grupos que receberam o pré-tratamento com K252a quando comparados com os respectivos pares sem pré-tratamento, além de uma morfologia celular mais arredondada, caracterizando a inibição da diferenciação celular induzida tanto pelo NGF quanto pelo CAR em função da inibição do receptor neurótrófico TrkA. Esse resultado claramente indica que o efeito neurotrófico do CAR está associado à ativação do receptor seletivo do NGF, TrkA, o que poderia ser devido à ativação direta pelo CAR (agonista) ou indireta através do aumento da expressão do próprio NGF. Ambas possibilidades foram avaliadas e são apresentadas nos itens 4.1.2.4 e 4.1.2.3, respectivamente.

Figura 10- Efeito da inibição do receptor TrkA sobre a neuritogênese induzida pelo CAR



Legenda: (A) Porcentagens de células PC12 com neuritos após 72 horas de tratamento. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média \pm desvio padrão. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN (controle negativo, sem tratamento). # Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CP (controle positivo, NGF 100 ng/mL). & Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CAR (carvacrol 12,5 μ M). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CN, DMSO (veículo, dimetilsulfóxido 0,1%) e K252a (inibidor farmacológico do receptor TrkA). (B-G) Fotomicrografias obtidas por microscopia invertida de contraste de fase após 72 horas de tratamento (aumento de 400x; escala de 10 μ M). (B) CN (controle negativo, células sem tratamento); (C) K252a 100 nM; (D) NGF 100 ng/mL; (E) pré-tratamento por 1 hora com K252a 100 nM seguido do tratamento

com NGF 100 ng/mL por 72 horas; (F) CAR 12,5 μ M; (G) pré-tratamento por 1 hora com K252a 100 nM seguido do tratamento com CAR 12,5 μ M por 72 horas.

Como a ativação do receptor TrkA resulta na ativação das vias MEK/ERK e PI3K/Akt, a participação de ambas no efeito neurotrófico do CAR também foi avaliada. A inibição da via MEK/ERK foi realizada através da inibição das quinases MEK 1 e 2 com o composto U0126; a inibição da via PI3K/Akt foi realizada através da inibição da Akt com o composto LY294002. A inibição das MEK 1 e 2 reduziu em 92% a formação de neuritos induzida pelo CAR (de $5,21 \pm 0,94$ % para $0,41 \pm 0,50$ %) e em 98% a neuritogênese promovida pelo NGF (de $4,58 \pm 1,02$ % para $0,11 \pm 0,34$ %). O tratamento das células com o DMSO 0,1% ($0,86 \pm 0,50$ %) ou com o inibidor U0126 ($0,22 \pm 0,38$ %) não diminuíram significativamente a porcentagem de células com neuritos em relação ao controle não tratado (figura 11 A, B e C). As fotomicrografias mostram a redução da diferenciação induzida pelo NGF (figura 11 D e E) e pelo carvacrol (figura 11 F e G) quando as células são pré-tratadas com o inibidor U0126, caracterizada pela redução de células com neuritos e pela morfologia mais arredondada das células.

Figura 11- Efeito da inibição da via MEK/ERK sobre a neuritogênese induzida pelo CAR

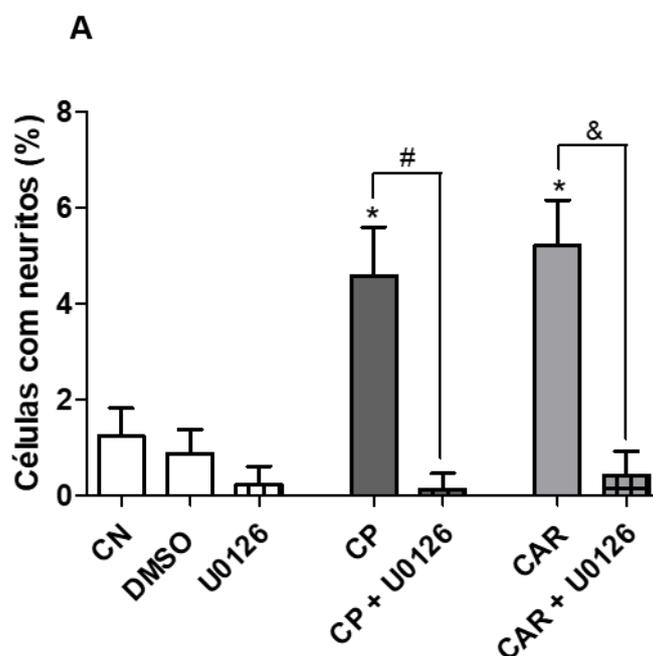
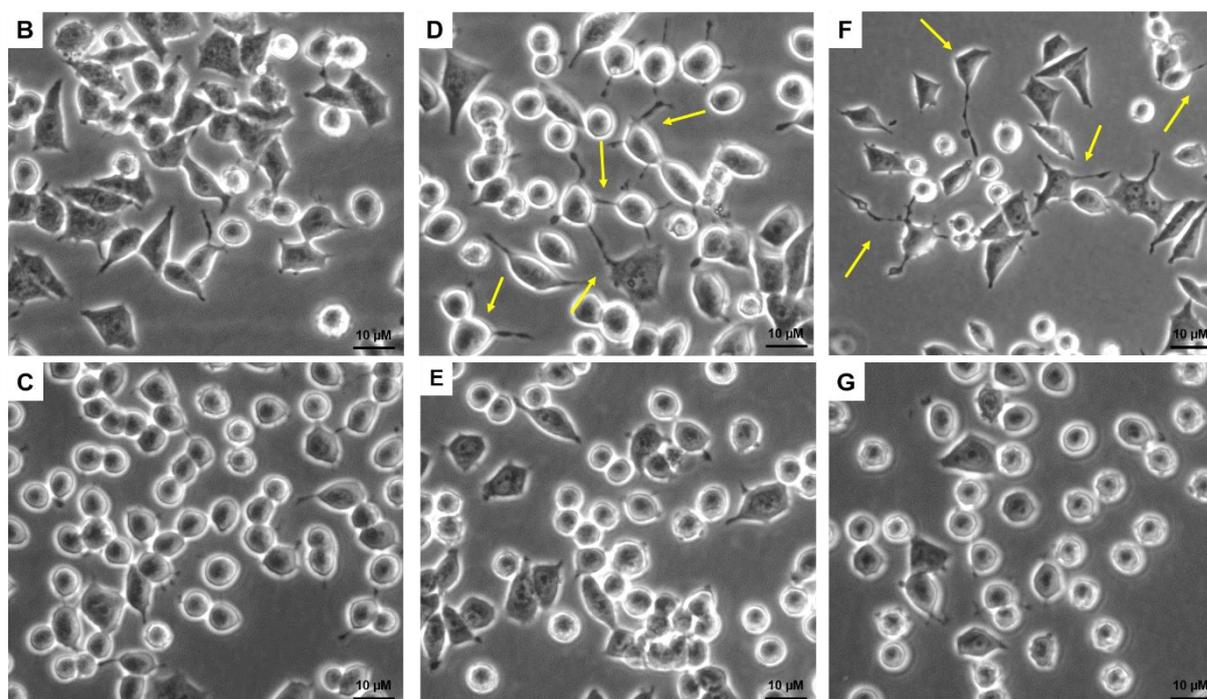


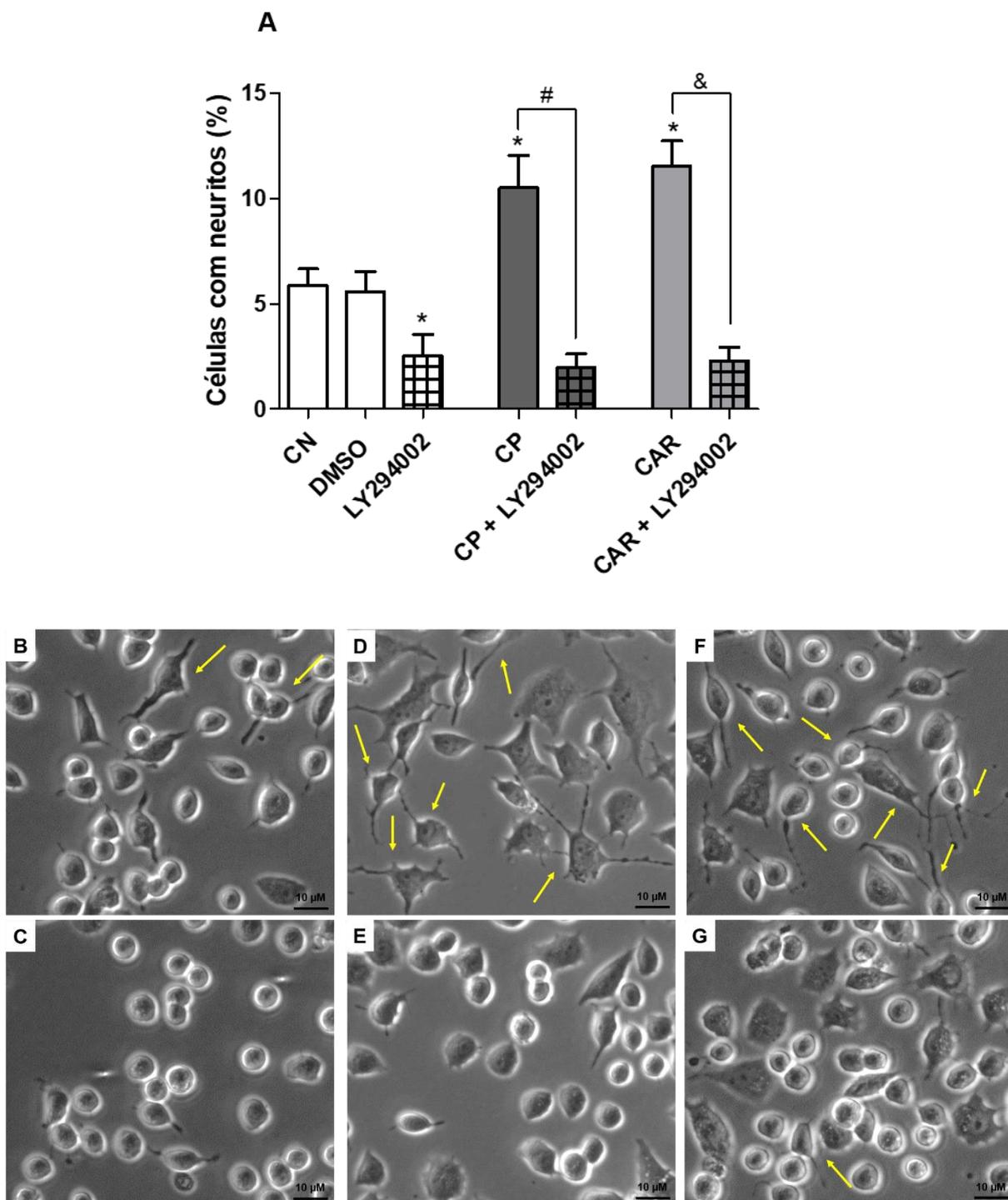
Figura 11- Continuação

Legenda: (A) Porcentagens de células PC12 com neuritos após 72 horas de tratamento. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média \pm desvio padrão. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN (controle negativo, sem tratamento). # Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CP (controle positivo, NGF 100 ng/mL). & Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CAR (carvacrol $12,5 \text{ } \mu\text{M}$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CN (controle negativo), DMSO (veículo, dimetilsulfóxido $0,1\%$) e U0126. (B-G) Fotomicrografias obtidas por microscopia invertida de contraste de fase após 72 horas tratamento (aumento de $400\times$; escala de $10 \text{ } \mu\text{M}$). (B-G) Fotomicrografias obtidas por microscopia de contraste de fase após 72 horas tratamento, representativas de cada grupo de células (aumento de $400\times$; escala de $10 \text{ } \mu\text{M}$). (B) CN (controle negativo, células sem tratamento); (C) U0126 $10 \text{ } \mu\text{M}$; (D) NGF 100 ng/mL ; (E) pré-tratamento por 1 hora com U0126 $10 \text{ } \mu\text{M}$ seguido do tratamento com NGF 100 ng/mL por 72 horas; (F) CAR $12,5 \text{ } \mu\text{M}$; (G) pré-tratamento por 1 hora com U0126 $10 \text{ } \mu\text{M}$ seguido do tratamento com CAR $12,5 \text{ } \mu\text{M}$ por 72 horas.

A inibição da ativação da Akt pelo composto LY294002 também reduziu significativamente a neuritogênese induzida pelo CAR (de $11,54 \pm 1,20 \%$ para $2,29 \pm 0,64 \%$) e pelo NGF (de $10,52 \pm 1,53 \%$ para $1,96 \pm 0,65 \%$) o que correspondeu a reduções de $81,2\%$ e $82,7\%$, respectivamente (figura 12 A). Os grupos que receberam pré-tratamento com o LY294002 também apresentaram morfologia celular arredondada e com reduzido número de neuritos, caracterizando a inibição da diferenciação celular. O grupo de células tratadas com o DMSO $0,1\%$ ($5,58 \pm 0,96 \%$) não apresentou alterações significativas em comparação ao controle sem tratamento ($5,88 \pm 0,78 \%$), enquanto que o composto LY294002 reduziu a neuritogênese para $2,52 \pm 1,03 \%$. As fotomicrografias mostram claramente a redução de células com

neuritos nos grupos pré-tratados com o inibidor em relação aos seus respectivos pares sem pré-tratamento, NGF (figura 12 D e E) e CAR (figura 12 F e G).

Figura 12- Efeito da inibição da via PI3K/AKT sobre a neuritogênese induzida pelo CAR



Legenda: (A) Porcentagens de células PC12 com neuritos após 72 horas de tratamento. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média \pm desvio padrão. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN (controle negativo, sem tratamento). # Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CP

(controle positivo, NGF 100 ng/mL). & Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CAR (carvacrol 12,5 μM). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CN (controle negativo), DMSO (veículo, dimetilsulfóxido 0,1%) e LY294002 30 μM . (B-G) Fotomicrografias obtidas por microscopia invertida de contraste de fase após 72 horas tratamento (aumento de 400x; escala de 10 μM). (B) CN (controle negativo, células sem tratamento); (C) LY294002 30 μM ; (D) NGF 100 ng/mL; (E) pré-tratamento por 1 hora com LY294002 30 μM seguido do tratamento com NGF 100 ng/mL por 72 horas; (F) CAR 12,5 μM ; (G) pré-tratamento por 1 hora com LY294002 30 μM seguido do tratamento com CAR 12,5 μM por 72 horas.

Os resultados apresentados nas figuras 10, 11 e 12 indicam que a neuritogênese induzida pelo CAR é dependente da ativação do receptor TrkA e das cascatas subsequentes PI3K/AKT e MEK/ERK, visto que a inibição dessas vias afetou significativamente a formação dos neuritos induzida pelo CAR. Assim como ocorreu com o NGF, a inibição da MEK 1/2 foi a que mais interferiu na neuritogênese induzida pelo CAR em comparação à inibição da Akt. Esse mesmo padrão de resposta foi observado no estudo de Seow e colaboradores que utilizou os mesmos inibidores para avaliar a atividade neuritogênica do composto 6-shogaol, encontrado no gengibre, também em modelo *in vitro* com as células PC12 (SEOW; HONG; LEE; MALEK *et al.*, 2017). A ação da MEK é essencial em todos os estágios da diferenciação: germinação, alongamento e ramificação de neuritos, crescimento axonal e formação sináptica, tanto das células PC12 quanto neuronais (BENNISON *et al.*, 2020; HUANG; REICHARDT, 2003). A fosforilação da MEK ativa diversas moléculas sinalizadoras que, por conseguinte, fosforilam e ativam o fator de transcrição CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico), responsável por controlar a expressão de genes indutores da sobrevivência e diferenciação neuronal (ARÉVALO; WU, 2006). Com relação à via PI3K/AKT, embora seja amplamente conhecida por sua importante atividade pró-sobrevivência, também possui papel fundamental na neurodiferenciação visto que é necessária para a germinação e manutenção da neuritogênese induzida pelo NGF e fitoquímicos neurotróficos (JACKSON *et al.*, 1996; SEOW *et al.*, 2017). Um dos possíveis mecanismos de ação da Akt envolve a inibição da GSK3 β , que reduz a fosforilação da MAP2 (proteína associada ao microtúbulo), o que possibilita a polimerização dos microtúbulos e reorganização da membrana e citoesqueleto, que induzem o alongamento dos neuritos (BENNISON *et al.*, 2020). Adicionalmente, ao ativar moléculas com atividades antioxidantes, a Akt protege as células contra a lipoperoxidação e de fato, inibidores da via PI3K/Akt aumentam a morte celular induzida pela toxina ACR, sugerindo que a ativação dessas quinases pelo CAR além de promover neuritogênese, pode proteger contra os danos induzidos

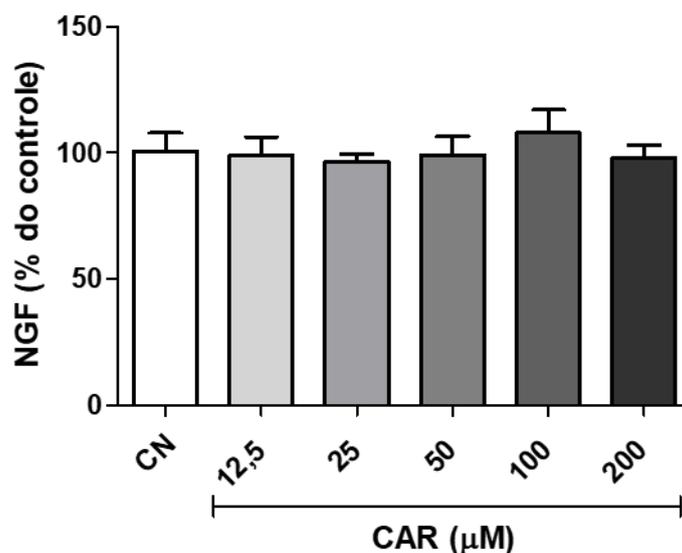
pela ACR (HO et al., 2020). Estudos anteriores também demonstraram que o CAR ativa as vias MEK/ERK e PI3K/AKT, mas correlacionaram esses eventos a efeitos antioxidantes e antiapoptóticos em modelos de toxicidade induzida por cádmio, etanol e em modelos de isquemia cerebral (BANIK et al., 2019; WANG et al., 2017; YU; ZHANG et al., 2012). Contudo, nosso estudo é o primeiro a associar a modulação dessas vias à atividade neuritogênica do CAR.

Devido às respostas semelhantes entre o CAR e NGF nos ensaios com os inibidores mostrados acima, levantamos a hipótese de que CAR poderia estar agindo indiretamente através do aumento da expressão dessa neurotrofina. Uma grande variedade de compostos naturais exerce atividade neurotrófica através do aumento da expressão de fatores neurotróficos como o BDNF e NGF, demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A curcumina e o resveratrol por exemplo induzem a expressão do BDNF, enquanto que o 6-shogaol, presente no gengibre, induz a biossíntese de NGF nas células PC12 após 48 horas de tratamento (GUPTA; SHARMA, 2017; NAOI et al., 2017; SEOW et al., 2017). Recentemente, Lee e colaboradores observaram aumento de BDNF no hipocampo de ratos após tratamento com CAR, protegendo-os contra neuroinflamação e déficit de memória gerados pela toxina lipopolissacarídeo (LPS) (LEE et al., 2020), o que suscita a idéia de que ele também poderia induzir a expressão do NGF. Então, para analisar essa hipótese, quantificamos as concentrações de NGF em culturas celulares tratadas com concentrações de CAR efetivas para indução de neuritos.

4.1.2.3 Efeito do CAR sobre a expressão do NGF

Como pode ser observado na figura 13, nenhuma das concentrações de CAR testadas alteraram de maneira significativa as concentrações de NGF. Apesar do ligeiro aumento gerado pela concentração de 100 μ M, este correspondeu a apenas 8% e não foi estatisticamente significativo em relação ao controle de células sem tratamento e aos demais tratamentos.

Figura 13- CAR não induz a biossíntese de NGF



Legenda: Níveis de NGF em culturas celulares após tratamento com diferentes concentrações de CAR (12,5; 25; 50; 100 e 200 µM) por 72 horas, por técnica de ELISA. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicatas foram expressos como média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle sem tratamento (CN: controle negativo); CAR: carvacrol.

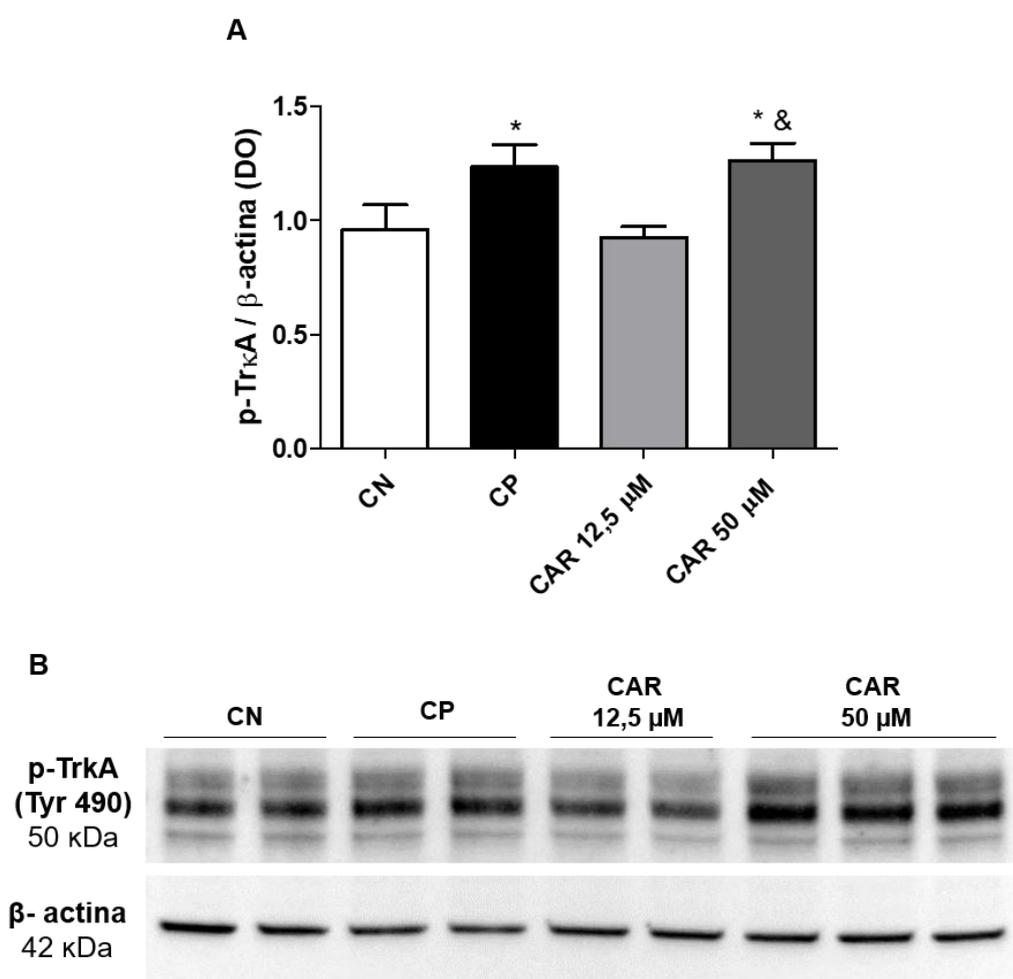
Esse resultado mostra que a atividade neurotrófica do CAR não envolve o aumento da biossíntese de NGF nas células PC12, sugerindo que o CAR ativa, por si só, o receptor TrkA, mimetizando a ação neurotrófica do NGF. Para confirmar essa hipótese, avaliamos se o CAR ativa o receptor TrkA, com base na fosforilação do resíduo de tirosina 490 (*Tyr490*), que interage com a proteína adaptadora Shc e desencadeia a ativação das cascatas MEK/ERK and PI3K/AKT, além de ser o principal resíduo do TrkA associado à indução de diferenciação neuronal (CASTALDO et al., 2019).

4.1.2.4 Efeito do CAR sobre a ativação do receptor TrkA

O período de tratamento para esse ensaio foi determinado após uma análise preliminar da fosforilação do receptor TrkA (p-TrkA) induzida pelo NGF após 20 minutos, 24 e 72 horas de tratamento. Como nenhuma alteração ocorreu nos primeiros 20 minutos e a expressão proteica foi maior após 24 horas de tratamento (resultado não mostrado), selecionamos esse período para avaliar o efeito do CAR.

Inicialmente constatamos que a concentração que induz 50% de neuritogênese após 72h ($EC_{50} = 12,5 \mu\text{M}$) não aumentou a expressão de p-TrkA em níveis detectáveis após 24 horas de tratamento. A partir disso, analisamos também uma concentração superior (CAR $50 \mu\text{M}$), uma das mais efetivas na indução da neuritogênese. O resultado mostrou um aumento significativo de 32% na expressão do p-TrkA após 24 horas de tratamento com CAR $50 \mu\text{M}$ ($1,26 \pm 0,07 \%$) em relação às células que não receberam tratamento ($0,95 \pm 0,11 \%$), efeito semelhante ao induzido pelo NGF ($1,23 \pm 0,09 \%$), que por sua vez elevou 29% a expressão do TrkA.

Figura 14- Ativação do receptor TrkA pelo CAR



Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de TrkA fosforilado (p-TrkA) no resíduo de tirosina 490, normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento das células PC12 por 24 horas. CN: controle negativo (células sem tratamento); CP: controle positivo (NGF 100 ng/mL); CAR: carvacrol (concentrações de $12,5$ e $50 \mu\text{M}$). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente em relação ao CN; & Significativamente diferente em relação ao CAR $12,5 \mu\text{M}$. (B) Imagem representativa das bandas de p-TrkA (Tyr490) e β -actina obtidas por Western Blot.

A ativação do TrkA pelo CAR confirma seu potencial neurotrófico *in vitro* e sugere que seja capaz de mimetizar a ação da neurotrofina endógena NGF. O presente estudo foi o primeiro a demonstrar esse efeito do CAR. (LEE et al., 2020) sugerem que a atividade neurotrófica do CAR envolve a biossíntese do BDNF e ativação do TrkB, receptor de alta afinidade e seletivo para o BDNF, o que fortalece as perspectivas sobre o seu potencial terapêutico contra as DNs. Outros fitoquímicos também apresentaram potencial de mimetizar a ação de neurotrofinas como por exemplo, a flavona 7,8-diidroxi-flavona, que ativa o receptor TrkB, e a amida gambógica isolada da *Garcinia hanburyi*, que ativa o receptor TrkA (NAOI et al., 2017).

A ativação de receptores Trk estimula a sobrevivência celular, interação e rearranjo dos componentes do citoesqueleto, formação de neuritos, axônios e dendritos, modulação da comunicação sináptica, dentre outros efeitos cruciais para o desenvolvimento e plasticidade dos neurônios. Nos neurônios colinérgicos, principalmente os localizados na região do hipocampo, o TrkA tem um papel particular nesses processos, no desenvolvimento da memória e estado cognitivo, não surpreendendo o fato de que a deficiência de NGF nos indivíduos acometidos pela DA esteja associada à atrofia e morte dessa população neuronal e que agonistas do TrkA sejam propostos como agentes capazes de resgatar o funcionamento adequado e a sobrevivência neuronal (GORDON, 2009; HUANG; REICHARDT, 2001). Nosso estudo sugere que CAR é um agente promissor para futuras estratégias de tratamento da DA. A fim de melhor compreender o mecanismo de sua atividade neurotrófica, investigamos sua capacidade de modular proteínas neurotípicas envolvidas na diferenciação e plasticidade neuronal.

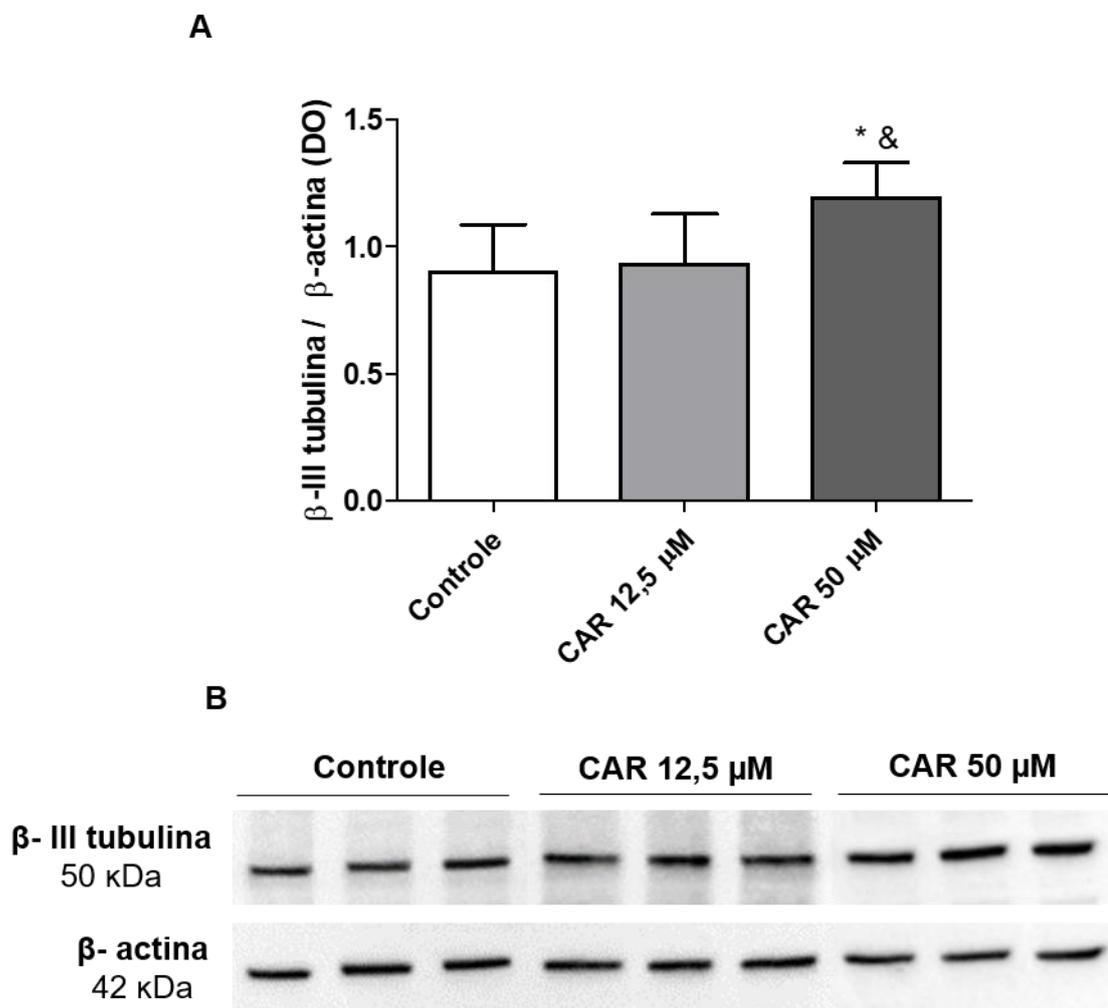
4.1.2.5 Efeito do CAR sobre a expressão de proteínas do citoesqueleto

Devido à importância do citoesqueleto na germinação, crescimento e regeneração dos neuritos, axônios e dendritos, analisamos o efeito do CAR sobre a expressão de proteínas que compõem o citoesqueleto: β -III tubulina, componente dos microtúbulos, filamentos de actina (F-actina) e neurofilamento de cadeia pesada (neurofilamento 200 kDa, NF-200).

O tratamento com CAR 12,5 μ M ($0,93 \pm 0,19$) por 72 horas não alterou significativamente a expressão da β -III tubulina em comparação ao grupo controle sem tratamento ($0,89 \pm 0,18$). Por outro lado, CAR 50 μ M ($1,19 \pm 0,13$) aumentou

significativamente (33%) os níveis da β -III tubulina em relação ao controle sem tratamento (figura 15).

Figura 15- Aumento da expressão da β -III tubulina induzida pelo CAR

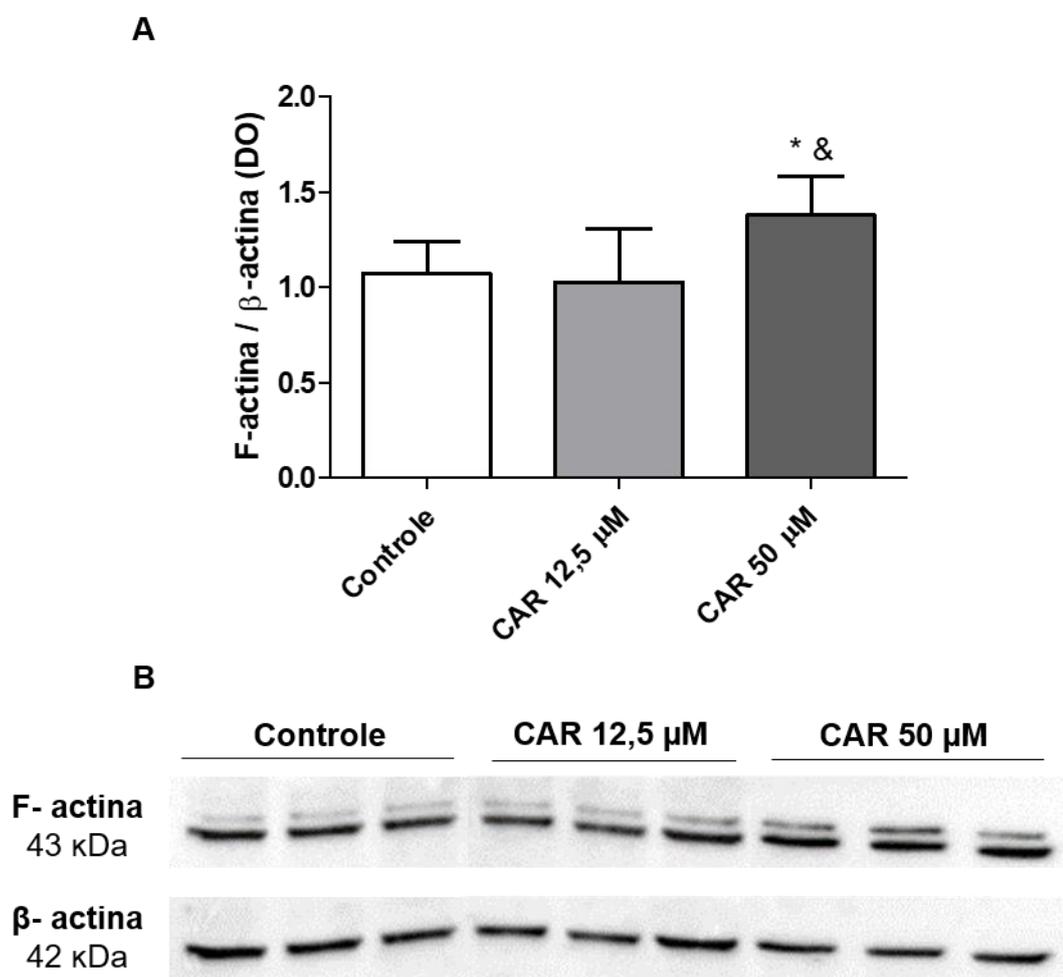


Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de β -III tubulina normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Controle: células sem tratamento; CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente do grupo controle; & Significativamente diferente do grupo CAR 12,5 μ M. (B) Imagem representativa das bandas de β - III tubulina e β -actina obtidas por Western Blot.

Por ser expressa especificamente em neurônios, a β -III tubulina é amplamente utilizada como um biomarcador do fenótipo neuronal inclusive em modelo com células PC12 no qual seus níveis se elevam durante a formação dos neuritos (ALETTA, 1996; SAINATH; GALLO, 2015); portanto, o aumento provocado pelo CAR confirma seu potencial de induzir neurodiferenciação *in vitro*.

Com relação à expressão da proteína F-actina, novamente apenas a maior concentração de CAR (50 μM) induziu aumento estatisticamente significativo ($1,37 \pm 0,20$) em relação ao controle de células sem tratamento ($1,07 \pm 0,16$) e esse efeito foi também significativamente maior em relação ao CAR 12,5 μM ($1,02 \pm 0,28$), como apresentado na figura 16.

Figura 16- Aumento da expressão da F-actina induzida pelo CAR



Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de F-actina normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente em relação ao controle; & Significativamente diferente em relação ao CAR 12,5 μM . (B) Imagem representativa das bandas de F-actina e β -actina obtidas por Western Blot.

A actina é um importante componente do citoesqueleto dos cones de crescimento axonal. O resultado mostrado na figura 16 sugere que o CAR tem o potencial de promover a polimerização, estabilização e distribuição da F-actina nos cones de crescimento axonal e dendrítico durante os processos de desenvolvimento e regeneração dos axônios (AVWENAGHA; CAMPBELL; BIRD, 2003).

Os neurofilamentos são componentes específicos das células neuronais, constituindo o componente estrutural mais abundante dos axônios; a neuritogênese induzida pelo NGF está associada ao aumento na expressão desses filamentos (LINDENBAUM et al., 1988). Ao analisarmos a expressão do NF-200 por imunocitoquímica observamos que tanto CAR 12,5 μM ($5,50 \times 10^6 \pm 0,95 \times 10^6$) quanto CAR 50 μM ($6,99 \times 10^6 \pm 0,94 \times 10^6$) induziram aumentos estatisticamente significativos na intensidade de fluorescência emitida pelas células após 72 horas de tratamento, em comparação ao grupo controle sem tratamento ($3,85 \times 10^6 \pm 0,67 \times 10^6$), como apresentado na figura 17A. Na figura 17 (B-D), além do aumento da intensidade da imunofluorescência do NF-200 por todo corpo celular, também é possível observar o aumento do número de células com prolongamentos neuríticos nos grupos tratados com CAR (figura 17 C e D).

Figura 17- Aumento da expressão do NF-200 induzida pelo CAR

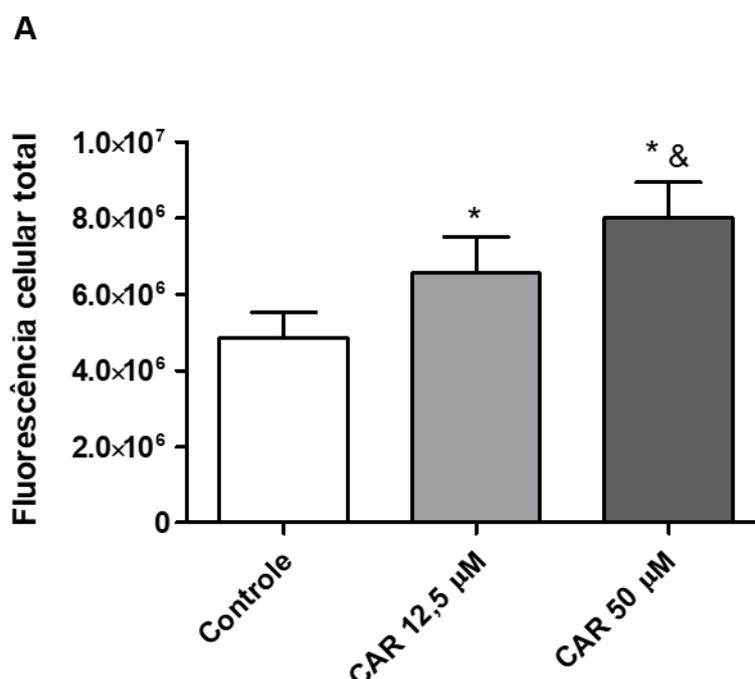
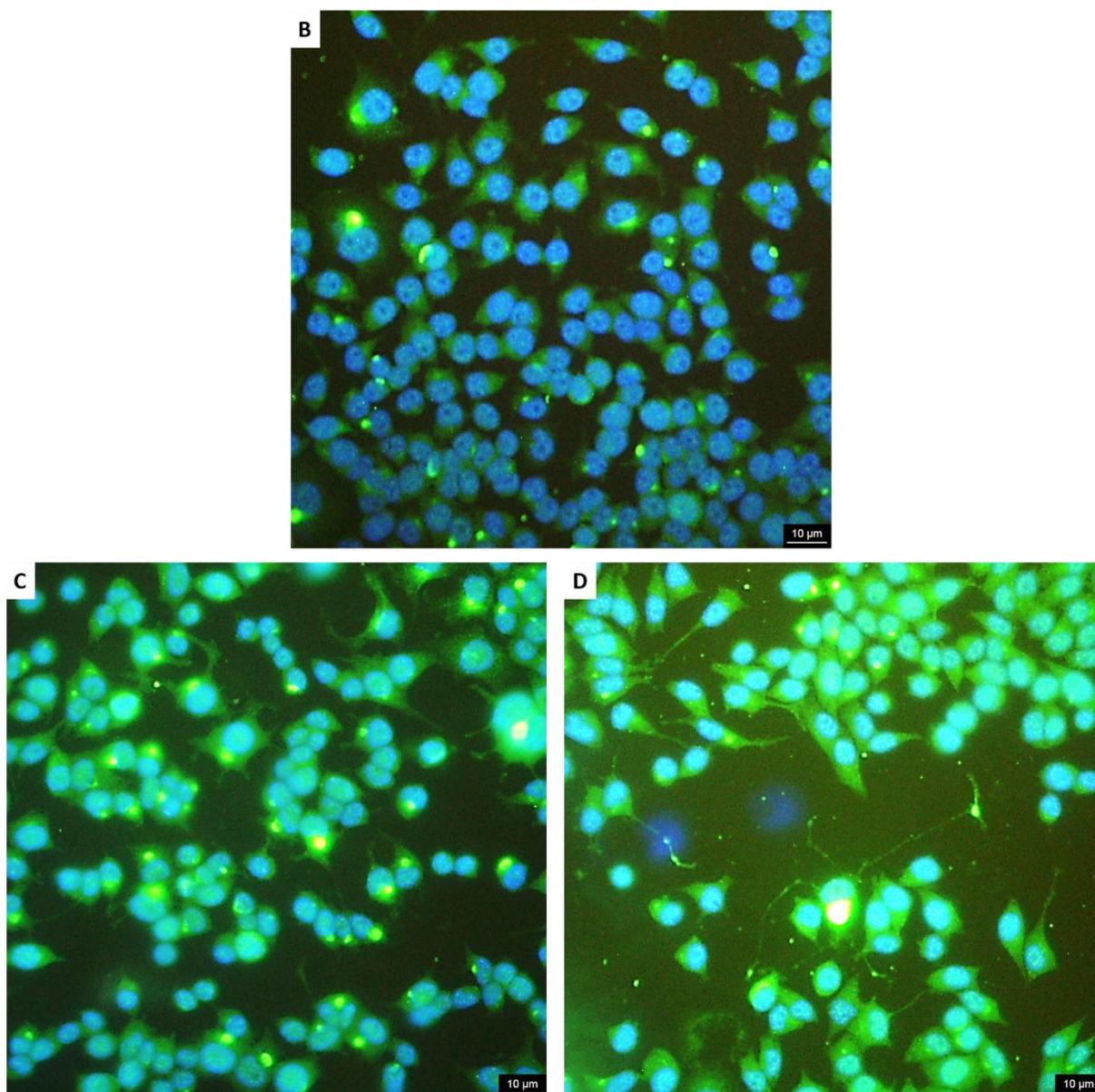


Figura 17- Continuação.



Legenda: (A) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pelo NF-200 após tratamento de células PC12 por 72 horas. Os valores obtidos a partir de quatro experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente em relação ao controle sem tratamento; & Significativamente diferente em relação ao CAR 12,5 μ M. (B-D) Imagens sobrepostas de NF-200 conjugado com FITC (cor verde) e núcleos corados com Hoechst 33342 (cor azul) representativas dos grupos: (B) Controle, células sem tratamento, (C) carvacrol 12,5 μ M, (D) carvacrol 50 μ M. Aumento de 40x; escala de 10 μ M.

O NF-200 é o principal componente dos axônios maduros; o aumento da expressão desse filamento observado em nosso estudo sugere que o CAR tem o potencial de modular a espessura do calibre axonal, o transporte axonal de moléculas

e organelas e a transmissão de impulsos elétricos (LEE; SHEA, 2014; YUAN et al., 2012). Em linha com nosso resultado, um estudo realizado recentemente também observou aumento do NF-200 e da subunidade de 160 kDa pelo CAR em nervos ciáticos de camundongos submetidos à axotomia, o que evitou a degradação dos axônios e conservou a estrutura das fibras nervosas (CHUN et al., 2020).

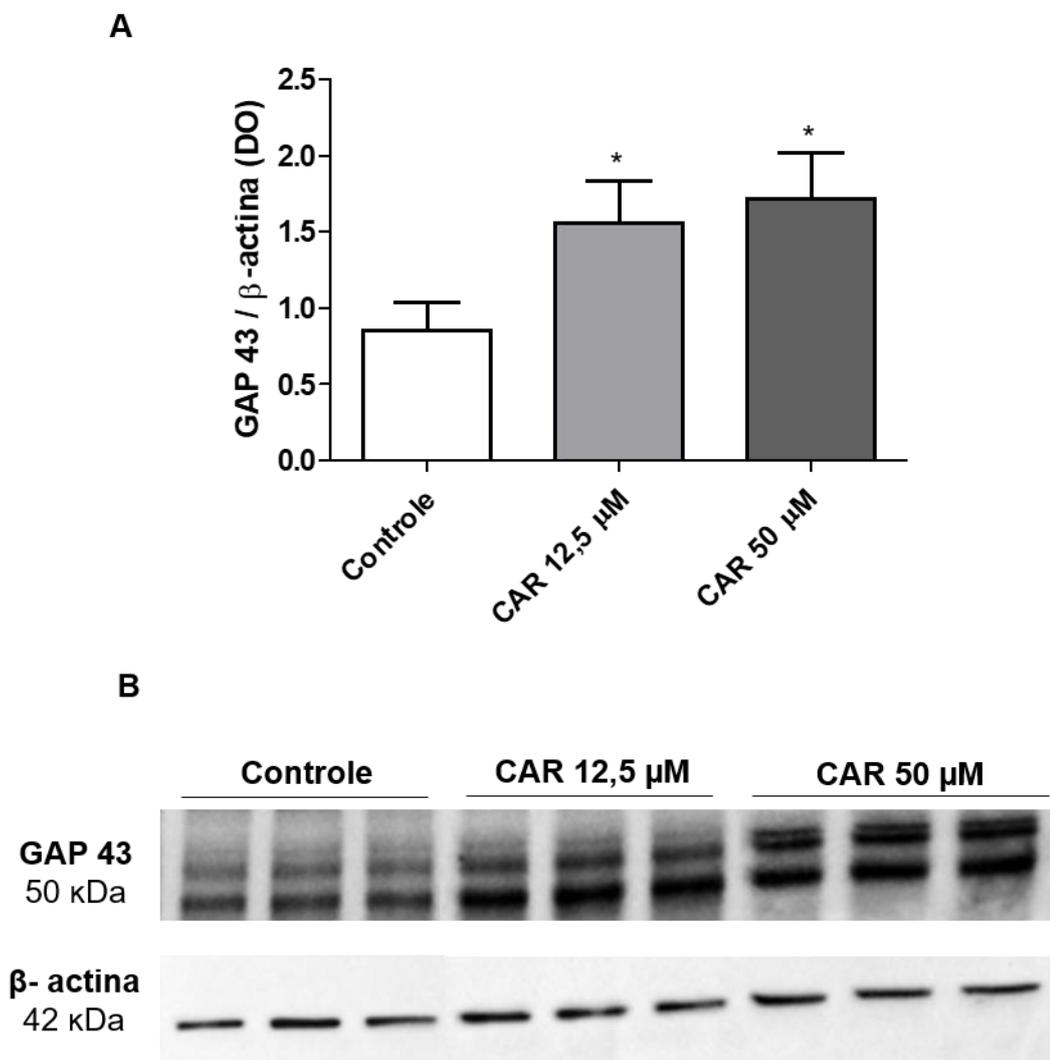
Em conjunto, os resultados mostrados nas figuras 15, 16 e 17 sugerem que o CAR tem o potencial de modular os principais componentes do citoesqueleto, que juntos possibilitam a formação e extensão dos neuritos, condizendo com as alterações morfológicas observadas. Mais ainda, sugerem que o CAR seja capaz de atuar sobre a remodelação do citoesqueleto, que é essencial para a propriedade plástica das células neuronais durante regeneração e restabelecimento de conexões eficazes (KAPITEIN; HOOGENRAAD, 2015).

4.1.2.6 Efeito do CAR na expressão da GAP-43

O aumento da expressão da proteína GAP-43 também está diretamente correlacionado à neuritogênese nas células PC12 (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Em neurônios, a GAP-43 encontra-se integrada à membrana da região do cone de crescimento axonal, onde regula a organização do citoesqueleto, principalmente a polimerização, estabilização e dinâmica dos filamentos de actina e favorece o crescimento dos axônios (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Além disso, ao associar-se a proteínas presentes em vesículas sinápticas, a GAP-43 regula a liberação de neurotransmissores e a endocitose, participando assim da sinaptogênese, relacionada aos processos de aprendizado e memória (MARKLUND et al., 2007). Seu nível aumenta significativamente durante o desenvolvimento e regeneração neuronal sendo considerado um importante indicador desses processos (DE LA MONTE et al., 2000). Devido à relevância da GAP-43 na neuroplasticidade, analisamos a capacidade do CAR em modular sua expressão.

Todos os tratamentos, CAR 12,5 μ M ($1,56 \pm 0,27$) e CAR 50 μ M ($1,72 \pm 0,29$) aumentaram significativamente a expressão da GAP-43 em relação ao controle de células sem tratamento ($0,85 \pm 0,18$), como apresentado na figura 18.

Figura 18- Aumento da expressão da GAP-43 induzida pelo CAR



Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de GAP-43 normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Controle: células sem tratamento; CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente do grupo controle; (B) Imagem representativa das bandas de GAP-43 e β -actina obtidas por Western Blot.

O efeito positivo do CAR sobre a expressão da GAP-43 sugere capacidade de induzir crescimento axonal, sinaptogênese e regeneração de neurônios visto que o aumento do RNA mensageiro e da proteína da GAP-43 correlacionam-se fortemente a esses processos (AVWENAGHA; CAMPBELL; BIRD, 2003). Essa proteína é capaz de estimular neurônios maduros a retornar ao estado de desenvolvimento de axônios novamente, o que possibilitaria aos neurônios sobreviventes nas DNs, restabelecer conexões funcionais, reduzindo a morte celular e amenizando os sintomas (CHUNG; SHUM; CARAVEO, 2020). De fato, Bae (2012) observou a capacidade do CAR de

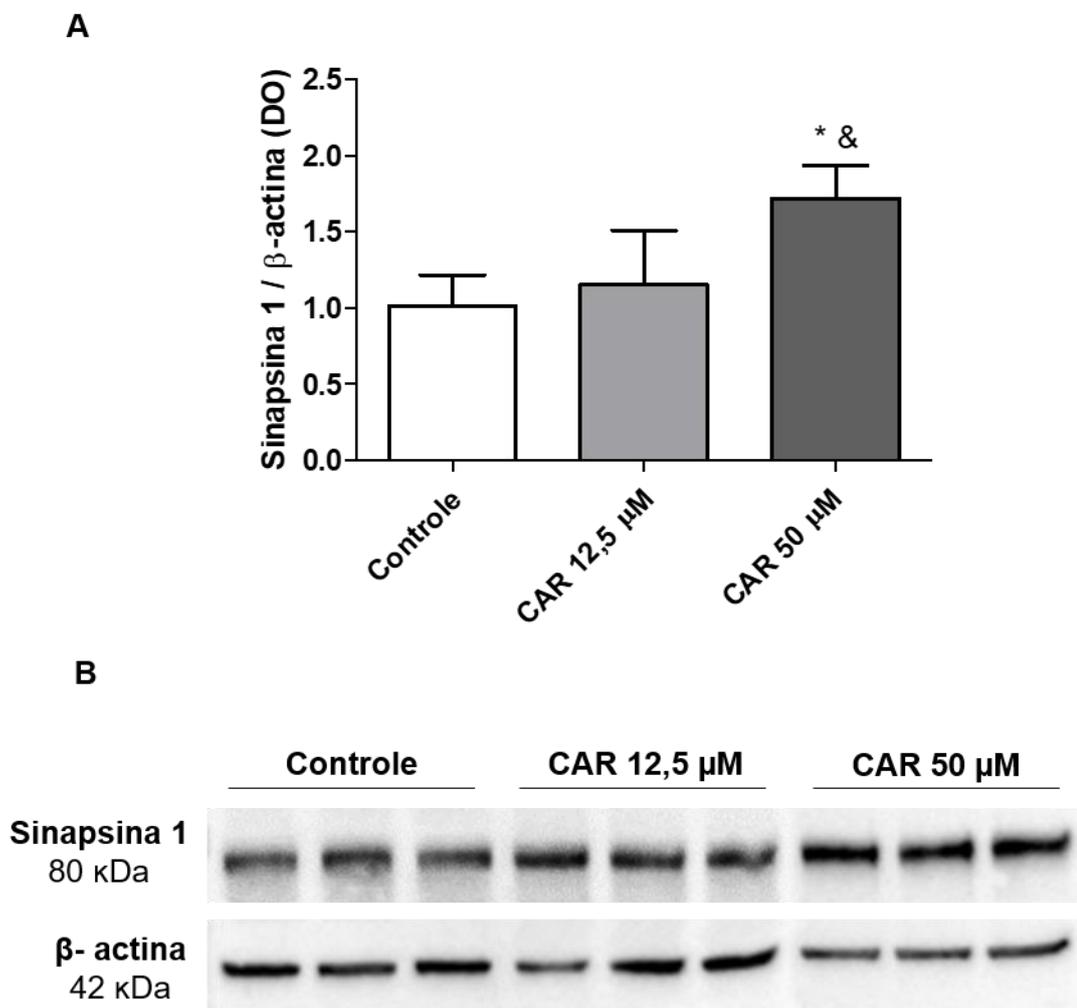
acelerar a maturação neuronal ao elevar os níveis dos marcadores de dendrito (MAP2) e axônios (Tau-1).

4.1.2.7 Efeito do CAR na expressão de proteínas associadas a vesículas sinápticas

A GAP-43 interage com proteínas sinápticas como a sinaptofisina e a SNAP-25, atuando na formação de sinapses. Por sua vez, a sinapsina 1 correlaciona-se diretamente à diferenciação das células PC12 (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004; ROMANO et al., 1987). Neste estudo, investigamos a modulação das proteínas sinápticas sinapsina 1 e sinaptofisina pelo CAR.

O tratamento celular com CAR 12,5 μM ($1,15 \pm 0,35$), não aumentou significativamente a expressão da sinapsina 1 após 72 horas de tratamento em comparação ao grupo controle sem tratamento ($1,00 \pm 0,20$). Em contrapartida, a exposição das células ao CAR 50 μM ($1,72 \pm 0,21$) resultou em alteração significativa que correspondeu a um aumento de 70% (figura 19).

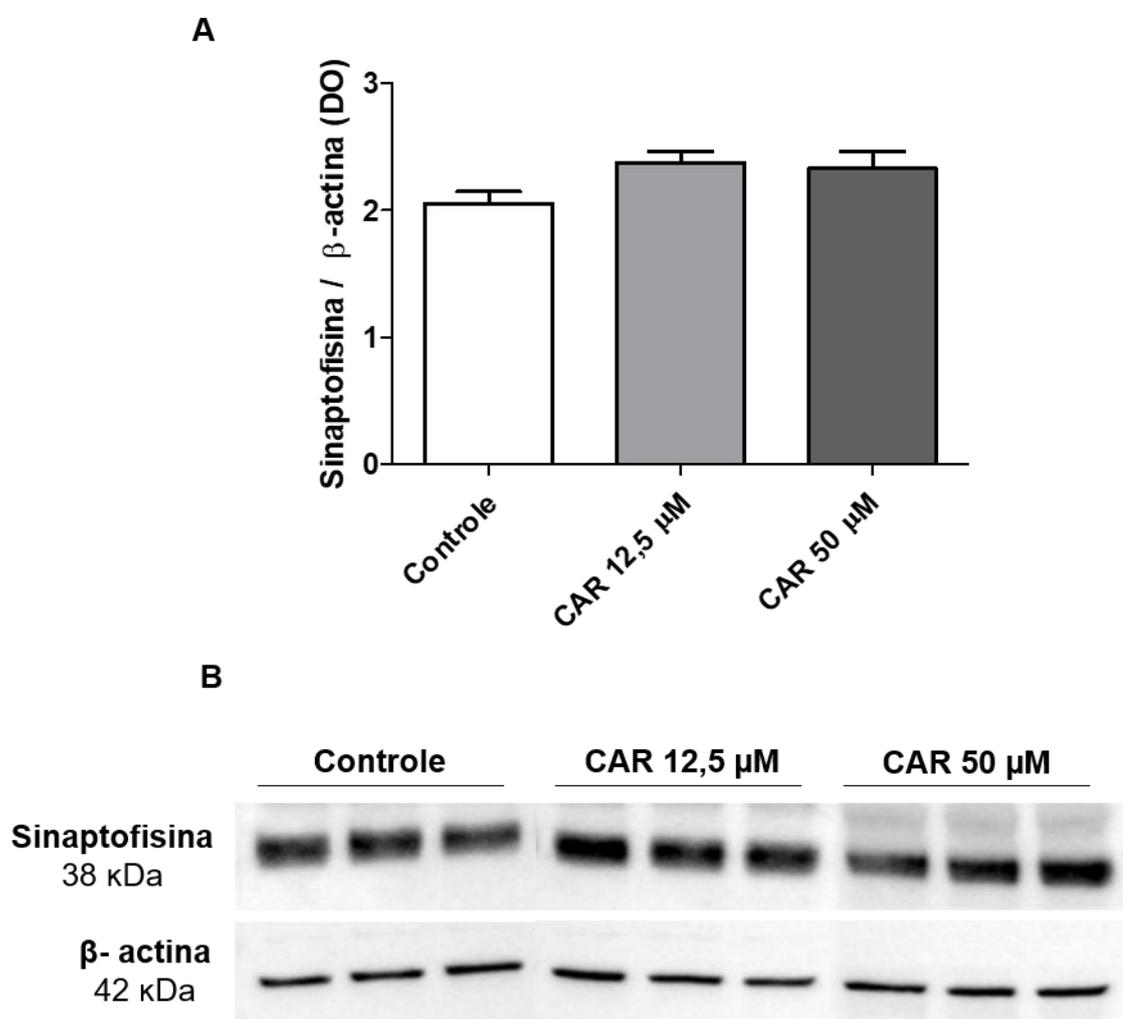
Figura 19- Aumento da expressão da sinapsina 1 induzida pelo CAR



Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de sinapsina 1 normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Controle: células sem tratamento; CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente do grupo controle; & Significativamente diferente do CAR 12,5 μ M. (B) Imagem representativa das bandas de sinapsina 1 e β -actina obtidas por Western Blot.

Em relação à sinaptofisina, nem CAR 12,5 μ M ($2,37 \pm 0,25$) e nem CAR 50 μ M ($2,32 \pm 0,38$) induziram alterações significativas na sua expressão em comparação ao grupo controle sem tratamento ($2,05 \pm 0,27$), como mostrado na figura 20.

Figura 20- CAR não altera a expressão da sinaptofisina



Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de sinaptofisina normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Controle: células sem tratamento; CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. (B) Imagem representativa das bandas de sinaptofisina e β -actina obtidas por Western Blot.

Durante o desenvolvimento neuronal *in vivo*, a expressão dessas proteínas aumenta drasticamente e por isso tem sido amplamente utilizadas como marcadores da maturação do terminal nervoso e comunicação sináptica (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Em neurônios primários, seus níveis aumentam de 5 a 10 vezes em 7 dias e coincide com a liberação de neurotransmissores. Na diferenciação das células PC12, a expressão da sinapsina 1 também se eleva e correlaciona com a formação de vesículas sinápticas (ROMANO et al., 1987). No estudo realizado por Das e

colaboradores, a expressão da sinapsina 1 aumentou cerca de 20% após 72 horas de exposição ao NGF (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Do mesmo modo, CAR 50 μ M aumentou significativamente os níveis da sinapsina 1, o que sugere que o CAR possa modular processos associados à essa proteína, como liberação dos neurotransmissores do terminal para a fenda, reciclagem e modulação da plasticidade sináptica (MIRZA; ZAHID, 2018). Um estudo abordando o potencial protetor do CAR contra os efeitos nocivos de uma dieta hipercalórica em hipocampo de ratos demonstrou que o CAR aumenta a expressão da sinapsina 1 (BARATASHVILI et al., 2018), o que está em consonância com nossos resultados. No entanto, ainda não há na literatura relatos do seu efeito sobre a sinaptofisina. No nosso estudo, não foi observada nenhuma alteração significativa no período de 72 horas nos grupos tratados com CAR. A regulação das diferentes proteínas associadas às vesículas sinápticas nas células PC12 pode ocorrer de maneira distinta e até mesmo contrária, entre uma e outra proteína. Lah e Burry (1993) observaram que os níveis basais da sinaptofisina foram se reduzindo progressivamente com a diferenciação induzida pelo NGF ao passo que a expressão da sinaptotagmina p65 foi aumentando. Adicionalmente, observou-se que o tratamento de células PC12 com NGF elevou os níveis da sinapsina 1 e reduziu os níveis da sinaptofisina (TAO-CHENG et al., 1995). Por outro lado, Hamada e colaboradores (2009) observaram aumento da sinaptofisina em células PC12 após 48 horas de tratamento com NGF. Essas diferenças podem dever-se às diferentes condições experimentais dos estudos ou ainda, indicar um processo dinâmico de modulação dessas proteínas durante o estímulo neurotrófico, no qual a expressão de uma proteína aumenta ao mesmo tempo em que a expressão de outra proteína diminui, podendo estar relacionado ao ciclo de excitose dos neurotransmissores e endocitose dos componentes das vesículas sinápticas (ZHU; XU; HEINEMANN, 2009).

Considerando as demais proteínas neurotípicas analisadas em nosso estudo, verificamos que os efeitos na neuritogênese e diferenciação celular induzidos pelo CAR 50 μ M foram mais eficazes do que na concentração de 12,5 μ M e envolveu o aumento da expressão dos três componentes do citoesqueleto (β -III tubulina, F-actina e NF-200), da proteína axonal GAP-43 e da proteína sináptica sinapsina 1. Devido à relevância da ativação do receptor neurotrófico TrkA e dessas proteínas para a plasticidade e regeneração axonal e sináptica, acreditamos que os achados do nosso estudo ajudam a explicar os efeitos neuroprotetores do CAR relatados por

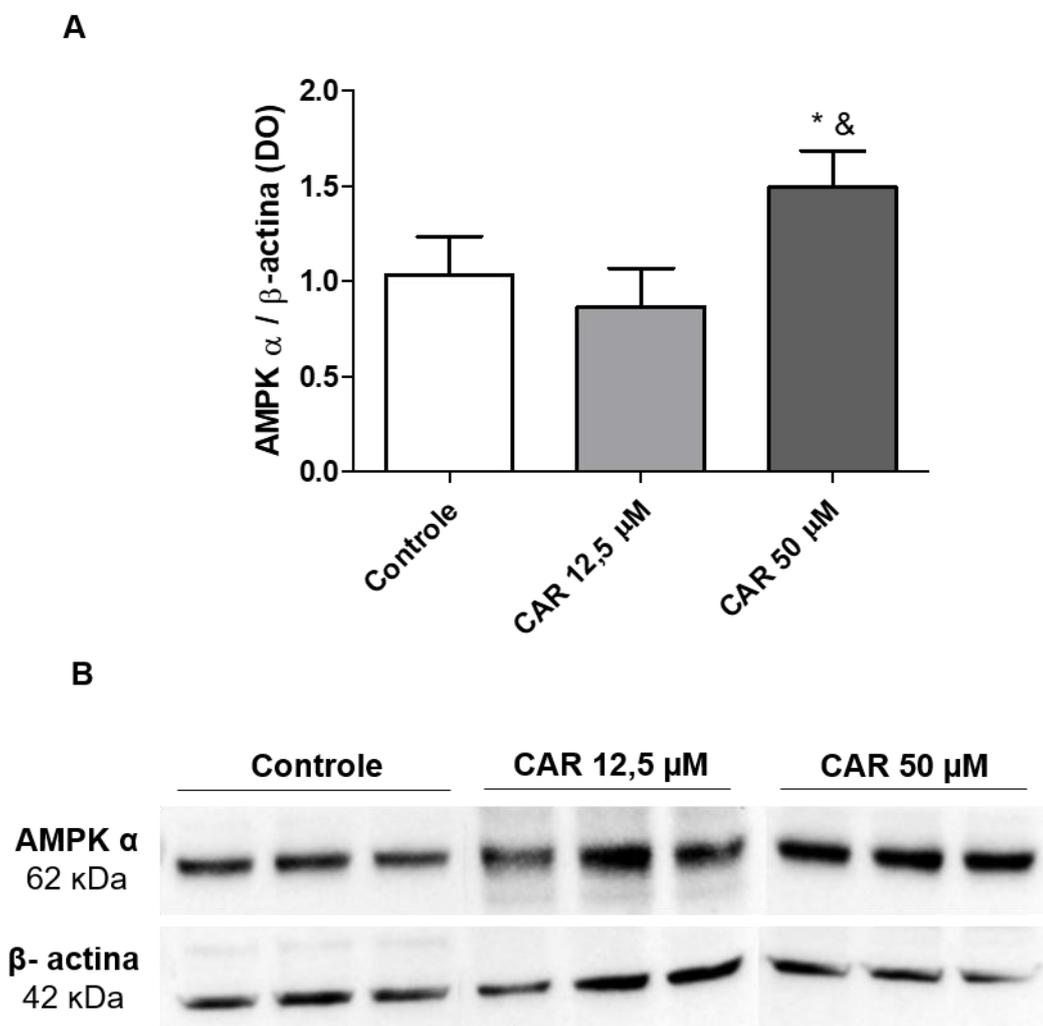
outros estudos e que, até então, foram atribuídos somente às suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica.

4.1.3 Efeitos do CAR na bioenergética celular

Para sustentar o intenso metabolismo celular durante a diferenciação, regeneração, plasticidade sináptica e outros processos, as células neuronais necessitam de um elevado e contínuo fornecimento de energia (BENNISON et al., 2020). No contexto das DNs, a constatação de diversas disfunções no metabolismo energético e a correlação com o estado neurodegenerativo sugerem que substâncias capazes de reestabelecer a homeostase energética podem fornecer as condições necessárias para as células neuronais se recuperarem dos danos sofridos (ZILBERTER; ZILBERTER, 2017). Considerando o papel da via AMPK/SIRT na regulação da homeostase energética e evidências da sua ativação pelo CAR em camundongos com esteatose hepática (KIM et al., 2013), investigamos o efeito do CAR sobre a bioenergética celular, através da avaliação da expressão da AMPK α , da SIRT1, além da captação celular de glicose e biossíntese de ATP nas células PC12.

A avaliação do efeito do CAR sobre a expressão da AMPK α revelou que apenas a concentração de 50 μ M ($1,49 \pm 0,19$) gerou um aumento estatisticamente significativo, equivalente a 45%, em comparação ao grupo de células que não recebeu tratamento ($1,03 \pm 0,20$). CAR 12,5 μ M ($0,86 \pm 0,20$) não alterou significativamente a expressão da AMPK α , como apresentado na figura 21.

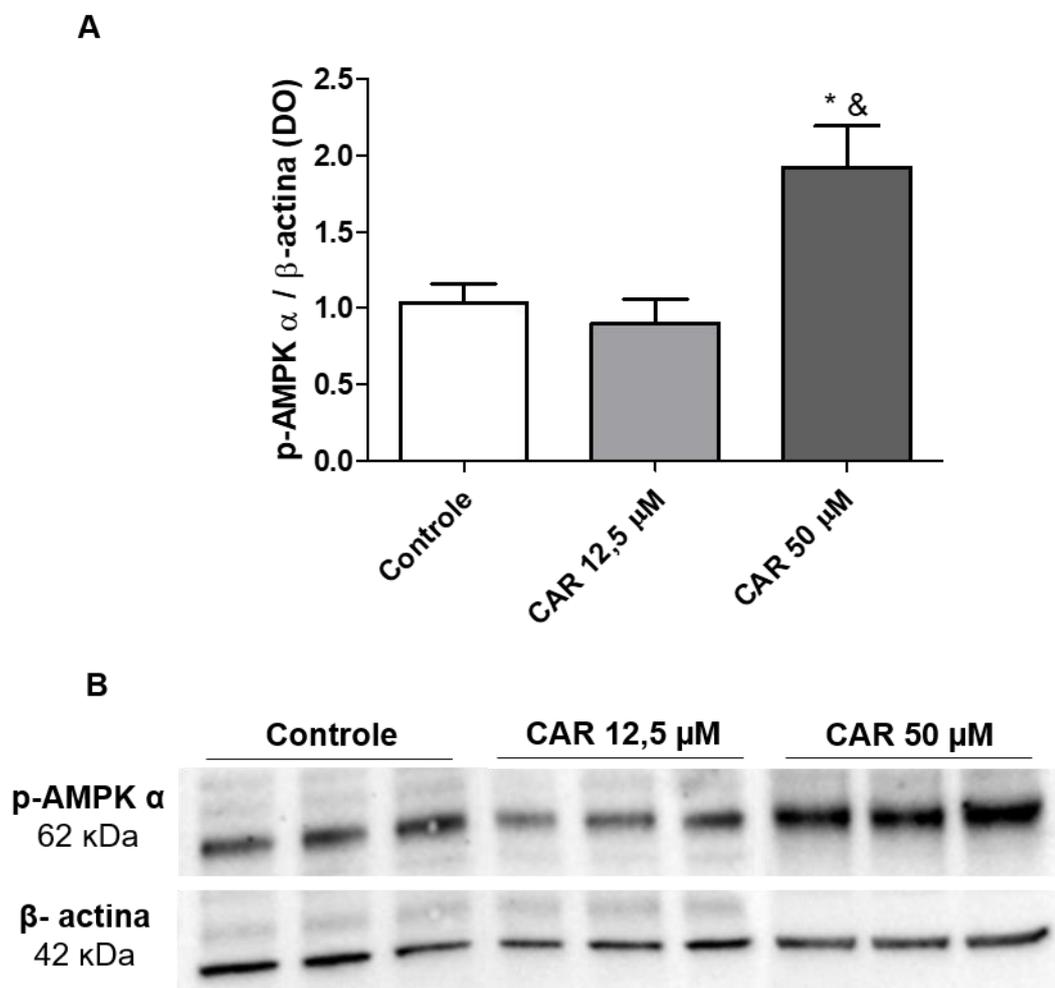
Figura 21- Aumento da expressão da AMPK α induzida pelo CAR



Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de AMPK α normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Controle: células sem tratamento; CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente do grupo controle; & Significativamente diferente do CAR 12,5 μ M. (B) Imagem representativa das bandas de AMPK α e β -actina obtidas por Western Blot.

O efeito do CAR sobre a expressão da AMPK α na forma ativa (fosforilada, p-AMPK α) também foi avaliado. CAR na concentração de 12,5 μ M ($0,90 \pm 0,15$) não alterou significativamente a expressão da p-AMPK α em comparação ao grupo de células que não recebeu tratamento ($1,03 \pm 0,12$). Em contrapartida, CAR 50 μ M ($1,92 \pm 0,27$) gerou um aumento estatisticamente significativo, equivalente a 86%, como pode ser observado na figura 22.

Figura 22- Aumento da expressão da p-AMPK α induzida pelo CAR



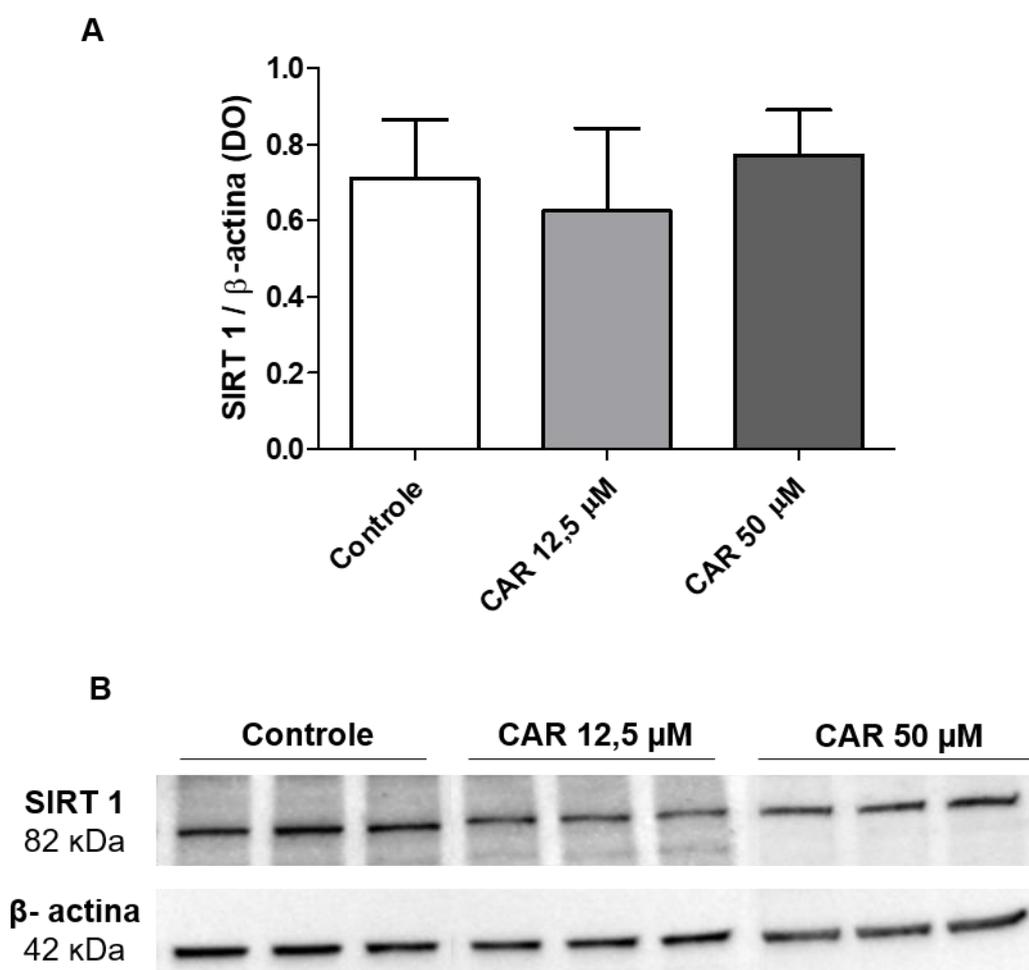
Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de p-AMPK α normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Controle: células sem tratamento; CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente do grupo controle; & Significativamente diferente do CAR 12,5 μ M. (B) Imagem representativa das bandas de p-AMPK α e β -actina obtidas por Western Blot.

O crescimento de neuritos e a transmissão sináptica são altamente dependentes de energia (RAEFSKY; MATTSON, 2017). Níveis baixos de ATP ativam a via AMPK/p-AMPK, que funciona como um sensor de bioenergia responsável por manter a homeostase energética em todas as células eucarióticas. A ativação da via AMPK/p-AMPK desempenha um papel importante na polarização neuronal e no crescimento axonal (AMATO; MAN, 2012; MARTORANA et al., 2018). Nossos resultados indicam que o CAR 50 μ M ativa a via AMPK / p-AMPK, o que aumenta os níveis celulares de ATP. Este efeito pode ser benéfico em processos

neurodegenerativos, pois estão associados à regulação negativa de p-AMPK α e disfunção bioenergética (PATHAK; BERTHET; NAKAMURA, 2013). Até o presente estudo, a capacidade do CAR de modular positivamente a atividade da AMPK α em modelo associado a células neuronais era desconhecida; nossos achados sugerem não somente um papel na regulação do metabolismo energético como também um efeito benéfico na DA, pois há evidências de que a ativação farmacológica da AMPK reduz o acúmulo extracelular de fragmentos β -amilóides (VINGTDEUX et al., 2010).

A ativação da AMPK aumenta os níveis intracelulares da NAD⁺ o que por conseguinte estimula a atividade da SIRT1, dentre outros efeitos (DUAN, 2013). No nosso estudo, a expressão da SIRT1 não foi alterada por nenhum dos tratamentos (CAR 12,5 μ M, $0,62 \pm 0,21$ e CAR 50 μ M, $0,77 \pm 0,11$) em relação ao controle sem tratamento ($0,71 \pm 0,15$), como apresentado na figura 23.

Figura 23- CAR não altera a expressão da SIRT 1

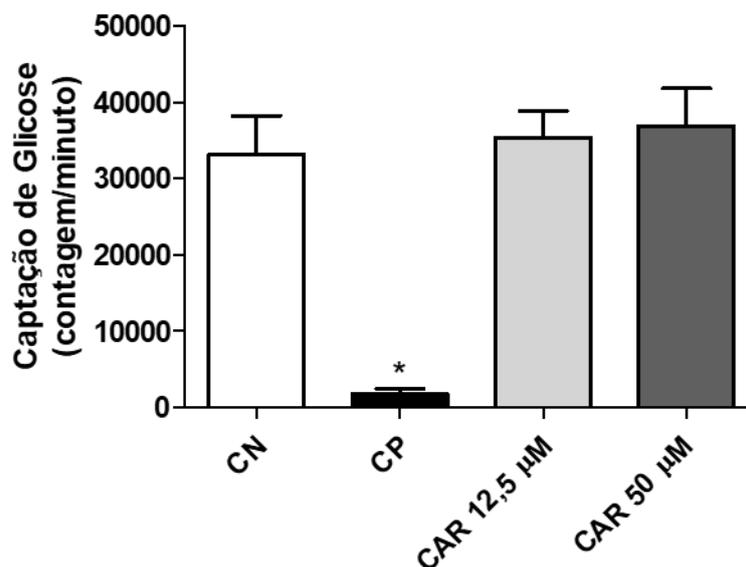


Legenda: (A) Representação gráfica da densidade óptica (DO) das bandas de SIRT 1 normalizada pela DO das bandas de β -actina, após tratamento de células PC12 por 72 horas. Controle: células sem tratamento; CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M). Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. (B) Imagem representativa das bandas de SIRT 1 e β -actina obtidas por Western Blot.

A ativação da SIRT1 é essencial para a neuritogênese induzida pelo NGF, visto que a inibição da SIRT1 afeta significativamente a formação dos neuritos (SUGINO et al., 2010). Embora o fitoquímico resveratrol seja conhecido por ativar tanto a AMPK quanto a SIRT1, um estudo mostrou que a diferenciação induzida pelo resveratrol nas células Neuro2a envolve a ativação da AMPK mas não é afetada por inibidores da SIRT1, sugerindo que fitoquímicos neurotróficos possam agir de maneira distinta do NGF (DASGUPTA; MILBRANDT, 2007; WU et al., 2011). Da mesma forma, no nosso estudo, a diferenciação das células PC12 pelo CAR também envolveu a ativação da AMPK α mas não foi associada ao aumento da expressão da SIRT1.

Como um dos efeitos promovidos pela AMPK é aumentar a captação de glicose pelas células para a posterior síntese de ATP (CETRULLO et al., 2015), investigamos se o CAR também atua positivamente sobre esses processos. No entanto, nenhuma das concentrações testadas (CAR 12,5 μ M: 35.434 ± 3.493 e CAR 50 μ M: 36.949 ± 4.962) aumentou significativamente a captação de glicose do meio extracelular após 72 horas, em relação ao controle de células que não recebeu tratamento (33.198 ± 5.013). Em contrapartida, a citocalasina B, inibidor dos canais que transportam a glicose inclusive a GLUT3, usada como controle positivo, reduziu de maneira eficaz a captação de glicose (1.786 ± 639) atestando a eficiência do ensaio (figura 24).

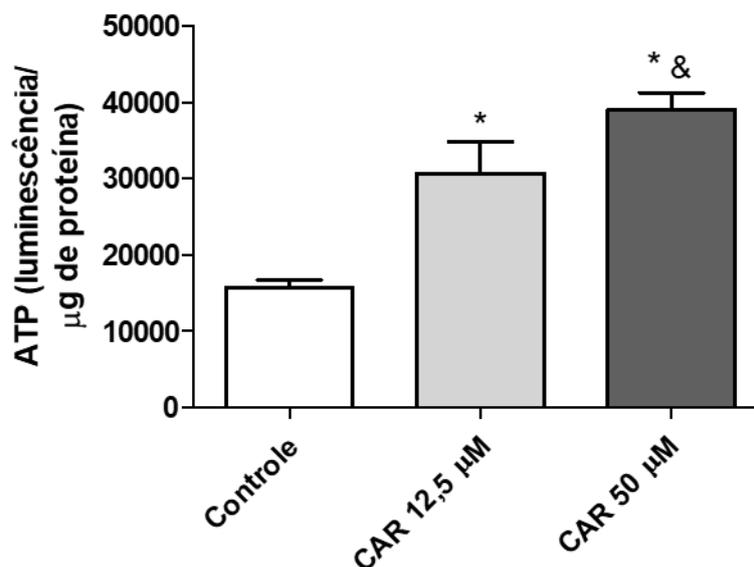
Figura 24- CAR não altera a captação celular de glicose



Legenda: Captação de glicose (*Deoxi-D-glicose* marcada com trício) pelas células PC12 após 72 horas de tratamento com CAR, expressa em contagem por minuto. A radioatividade foi detectada em contador de cintilação líquida Microbeta 1450 LSC Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA) e os valores obtidos de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente em relação ao CN. CN: controle negativo (células sem tratamento); CP: controle positivo (Citalcalasina B 10 μ M); CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μ M).

Curiosamente, ao avaliarmos os níveis de ATP no mesmo período de tratamento constatamos aumentos significativos tanto no grupo tratado com CAR 12,5 μ M (30.738 ± 4.122) quanto naquele tratado com CAR 50 μ M (39.109 ± 2.149) correspondentes a aumentos de 95% e 148%, respectivamente, em relação às células sem tratamento (15.785 ± 940), dados apresentados na figura 25.

Figura 25- Biossíntese de ATP induzida pelo CAR



Legenda: Intensidade de luminescência emitida pela oxidação da D-luciferina, que é proporcional à concentração de ATP, normalizada pela concentração de proteína (μg), em células PC12 após 72 horas de tratamento com CAR. A luminescência foi monitorada em leitor de microplaca TriStar² S LB 942 (Berthold) e os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente em relação ao controle. & Significativamente diferente em relação ao CAR 12,5 μM . Controle: (células sem tratamento); CAR: carvacrol (concentrações de 12,5 e 50 μM).

Esse resultado revela que o CAR age sobre o metabolismo energético celular, aumentando a síntese de ATP aos níveis necessários para a diferenciação neuronal. Embora a produção de ATP tenha sido induzida pelas duas concentrações, 12,5 e 50 μM , somente a maior concentração (CAR 50 μM) ativou o AMPK em níveis detectáveis. O efeito da ativação da AMPK é regular o metabolismo de modo a diminuir os processos anabólicos (ou seja, o consumo de ATP) e aumentar o catabolismo (ou seja, a produção de ATP) restabelecendo a homeostase energética durante os processos que demandam mais energia, como a neuritogênese (HERZIG; SHAW, 2018). Também seria esperado o aumento da captação celular de glicose para a produção do ATP. É possível que ela tenha ocorrido em um período anterior às 72 horas analisadas em nosso estudo, como relatado anteriormente para o NGF (GEETHA et al., 2013), que aumentou a captação de glicose nas células PC12 após apenas 20 minutos de tratamento. O efeito do CAR sobre os transportadores de glicose GLUT3, que são os expressos nas células PC12, ainda é desconhecido, mas

sabe-se que ele promove a translocação dos transportadores GLUT4 para a membrana celular de cardiomiócitos de camundongos diabéticos aumentando o influxo celular e reduzindo os níveis de glicose na corrente sanguínea (HOU et al., 2019). Dessa forma, novos estudos são necessários para melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na modulação do metabolismo energético do CAR em células neuronais.

Em conjunto, esses resultados indicam que o CAR tem atividade neurotrófica e promove a diferenciação neuronal das células PC12 ao mesmo tempo em que estimula o fornecimento energético necessário para sustentar esses processos, o que, teoricamente, favoreceria a regeneração axonal e retardaria a progressão das DNs. Corroborando nossos resultados e nossa hipótese com relação à neuroproteção, CAR também teve efeito positivo no metabolismo energético em outro modelo neuronal, células SH-SY5Y, e protegeu contra reduções na atividade de enzimas mitocondriais de defesa antioxidante e diminuição dos níveis de ATP causados pelo pró-oxidante peróxido de hidrogênio (CHENET et al., 2019). No nosso estudo, investigamos o potencial neuroprotetor do CAR contra a toxina ACR, um aldeído α , β insaturado cujo acúmulo anormal tem sido associado à patogênese das doenças neurodegenerativas do SNC (HUANG et al., 2021).

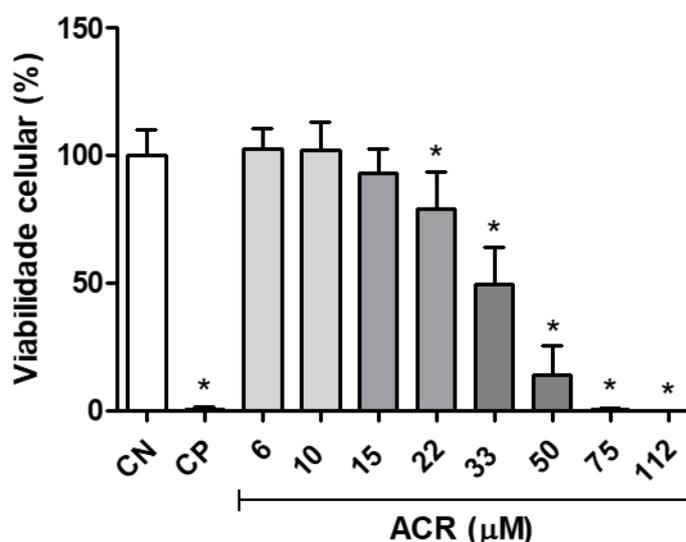
4.2 Avaliação do potencial neuroprotetor do CAR contra a neurotoxicidade da ACR

4.2.1 Ensaio de viabilidade celular

Primeiramente, o ensaio de redução do MTT foi realizado para determinação das concentrações de ACR que não interferem na viabilidade das células PC12 após 72 horas de tratamento. Para isso, foram testadas diversas concentrações obtidas a partir de diluições seriadas de ACR 112 μ M. O resultado obtido mostrou que as três menores concentrações (6 μ M, 102,60 \pm 7,86%; 10 μ M, 102,00 \pm 10,82%; 15 μ M, 93,04 \pm 9,31%) não alteraram significativamente a porcentagem de células viáveis. A ACR 15 μ M (93,04 \pm 9,31%) reduziu em 7% a viabilidade celular, porém, esse efeito não foi estatisticamente significativo em relação ao controle de células que não receberam tratamento (100,00 \pm 10,18%). As concentrações acima de 15 μ M (22 μ M, 79,10 \pm 14,62%; 33 μ M, 49,44 \pm 14,63%; 50

μM , $14,12 \pm 11,41\%$; $75 \mu\text{M}$, $0,47 \pm 0,68\%$; e $112 \mu\text{M}$, $0,04 \pm 0,14\%$) reduziram significativamente a viabilidade das células em 21%, 50%, 86%, 99% e 100%, respectivamente. Por sua vez, o controle positivo tratado com Triton X-100 0,2% ($0,70 \pm 0,78\%$) reduziu em 99,3% a porcentagem de células viáveis (figura 26).

Figura 26- Viabilidade de células PC12 expostas à ACR



Legenda: Porcentagens de células PC12 viáveis determinadas através do método do MTT após 72 horas de tratamento com diversas concentrações de ACR (6 μM a 112 μM). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em nove replicatas e expressos como média \pm desvio padrão * Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento (CN). CP: controle positivo (Triton X-100 0,2%); ACR: acroleína (μM).

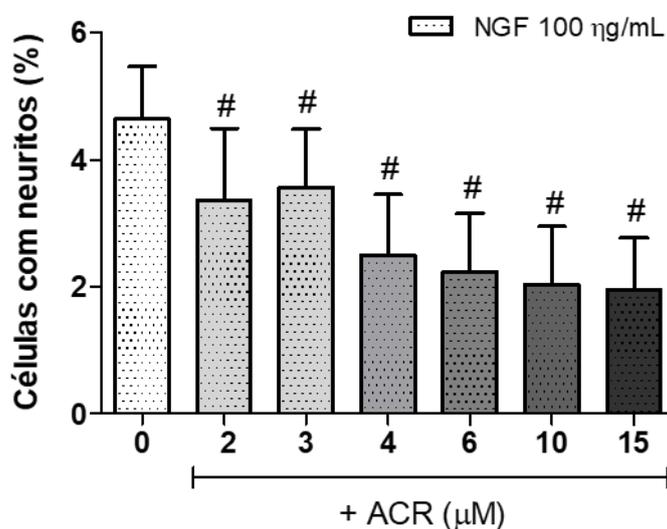
Esse resultado indica que a citotoxicidade induzida pela ACR é dependente da concentração. Um estudo anterior relata morte de praticamente todas as células PC12 que foram expostas a concentrações de 75 e 100 μM após 4 horas de tratamento (LIU-SNYDER et al., 2006). A ACR inibe diretamente a cadeia respiratória das mitocôndrias reduzindo os níveis de ATP, o que favorece a morte celular por necrose (LIU-SNYDER et al., 2006; LUO; ROBINSON; SHI, 2005). Com base em nossos dados, selecionamos concentrações que não interferiram na viabilidade das células PC12 (inferiores a 15 μM) para avaliar seu efeito sobre a neuritogênese induzida pelo NGF, bem como a neuroproteção do CAR contra esses efeitos.

4.2.2 Ensaios de neurodiferenciação

4.2.2.1 Efeito da ACR sobre a neuritogênese induzida pelo NGF

Para observarmos o efeito da ACR na neuritogênese induzida pelo NGF, as células foram estimuladas com NGF 100 ng/mL e tratadas com diversas concentrações de ACR (2 µM, 3 µM, 4 µM, 6 µM, 10 µM e 15 µM) por 72 horas. Todas as concentrações de ACR avaliadas interferiram significativamente na formação de neuritos pelo NGF. As duas menores concentrações (ACR 2 µM, $3,37 \pm 1,12\%$; 3 µM, $3,56 \pm 0,91\%$) foram as que menos afetaram a neuritogênese e corresponderam a reduções de 27,37% e 23,27%, respectivamente, em relação às células tratadas somente com o NGF ($4,64 \pm 0,82\%$). Acima de 3 µM, o efeito foi mais pronunciado, com reduções de 46,33%, 51,93%, 56,25% e 57,75% nos grupos de células tratadas com ACR 4 µM ($2,49 \pm 0,95\%$), 6 µM ($2,23 \pm 0,92\%$), 10 µM ($2,03 \pm 0,91\%$) e 15 µM ($1,96 \pm 0,80\%$), respectivamente (figura 27).

Figura 27- Redução da neuritogênese induzida pela ACR



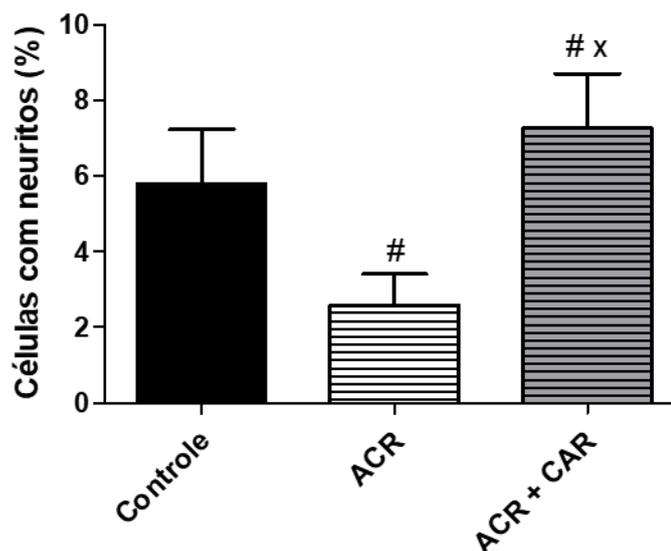
Legenda: Porcentagens de células PC12 com neuritos após 72 horas de tratamento com NGF e ACR. Grupos de tratamento: controle positivo (NGF 100 ng/mL); NGF 100 ng/mL + ACR 2 µM; NGF 100 ng/mL + ACR 3 µM; NGF 100 ng/mL + ACR 4 µM; NGF 100 ng/mL + ACR 6 µM; NGF 100 ng/mL + ACR 10 µM; NGF 100 ng/mL + ACR 15 µM. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão. # Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo (NGF 100 ng/mL).

No presente estudo, todas as concentrações de ACR testadas interferiram de maneira significativa na formação de neuritos pelo NGF o que sugere uma possível participação dessa toxina no dano axonal associado às DNs. Um possível mecanismo pode ter sido a inibição das vias de sinalização neurotrófica ativadas pelo receptor TrkA, visto que estudos anteriores mostraram que a ACR inibe a ativação de outro receptor neurotrófico da família das tirosino-quinases, TrkB, em células da linhagem HT-22 do hipocampo de camundongos (KHORAMJOUY et al., 2021). Apesar de diversos estudos relatarem a ação degenerativa da ACR sobre o citoesqueleto de neurônios e outros tipos celulares, não há relatos na literatura sobre seu efeito na neuritogênese induzida pelo NGF (KOERKER; BERLIN; SCHNEIDER, 1976; SMITH et al., 1990). Resultados semelhantes ao nosso foram obtidos em cultura de células de neuroblastoma após 24 horas de tratamento com ACR, no qual a concentração que inibiu 50% da neuritogênese (IC_{50}) foi de $7,6 \mu M$ (KOERKER; BERLIN; SCHNEIDER, 1976). No entanto, não foi descrito como a neuritogênese e diferenciação das células foi induzida para avaliar o efeito da ACR sobre esse processo. Recentemente, em um estudo em cultura primária de neurônios isolados do córtex cerebral de ratos, observou-se inchaço, fragmentações e encurtamento dos prolongamentos neuríticos após tratamento com ACR 20 e $30 \mu M$ por 24 horas, ressaltando a importância de estratégias protetoras contra os efeitos dessa toxina (HUANG et al., 2021). Assim, investigamos se o fitoquímico CAR inibe os efeitos inibitórios da ACR sobre a neuritogênese. Para tal, selecionamos a concentração de $6 \mu M$ de ACR, que reduziu cerca de 50% da neuritogênese induzida pelo NGF.

4.2.2.2 Proteção do CAR contra a redução da neuritogênese induzida pela ACR

Além de impedir a redução da neuritogênese induzida pela ACR ($2,58 \pm 0,83 \%$), o tratamento com CAR ($7,27 \pm 1,43 \%$) aumentou significativamente a porcentagem de células com neuritos em comparação ao grupo de células tratadas somente com o NGF (controle, $5,79 \pm 1,45 \%$), como apresentado na figura 28.

Figura 28- Efeito protetor do CAR contra a redução na neuritogênese induzida pela ACR



Legenda: Porcentagens de células PC12 com neuritos após 72 horas de tratamento com NGF, ACR e CAR. Grupos de tratamento: controle (NGF 100 ng/mL); ACR: NGF 100 ng/mL e ACR 6 µM; ACR + CAR: NGF 100 ng/mL e ACR 6 µM e CAR 12,5 µM. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão. # Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle. x Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação à ACR.

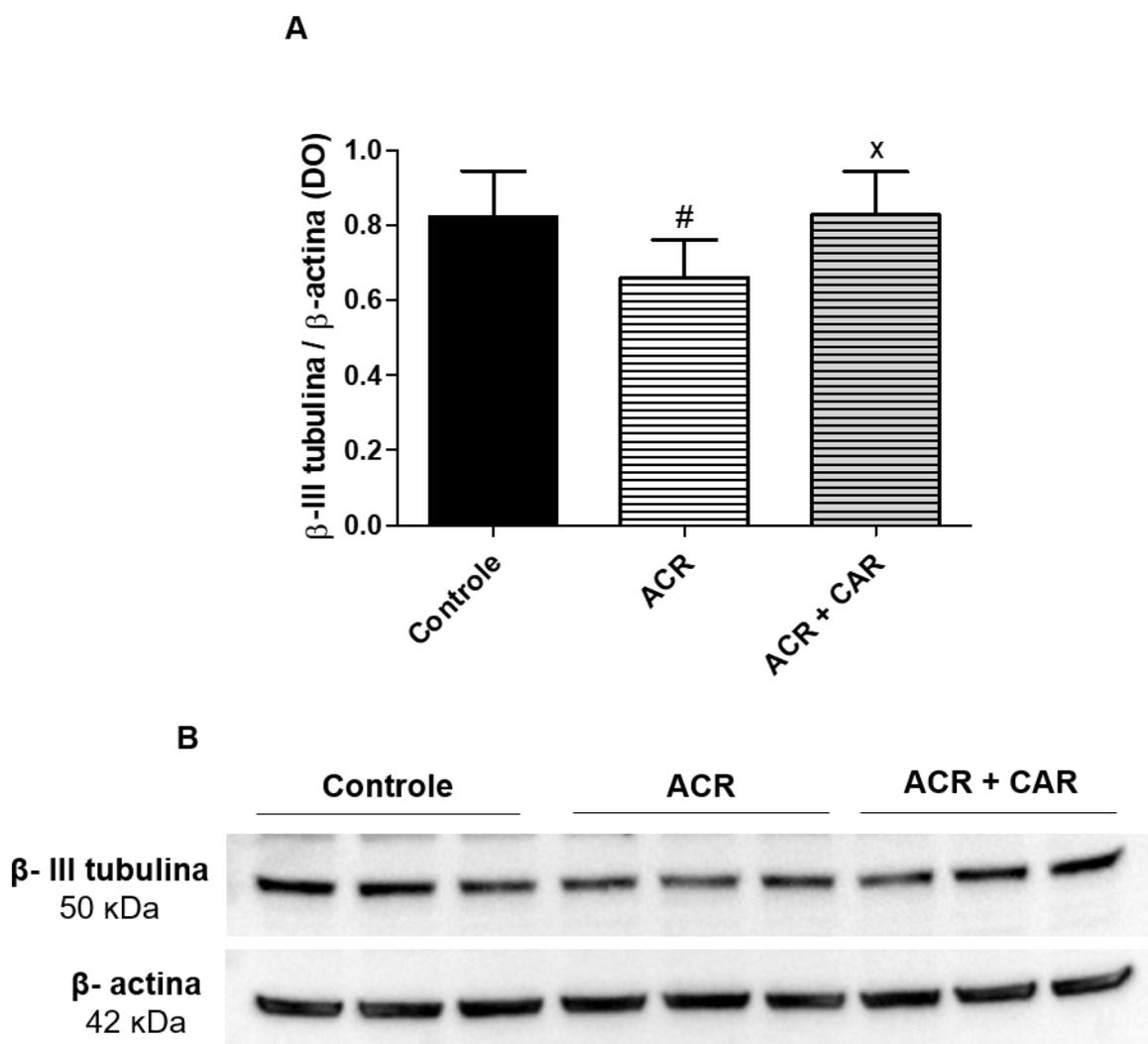
A degeneração de neuritos e axônios são achados característicos de várias DNs como a ELA, DA e DP. A capacidade de inibir a redução da neuritogênese causada pela ACR, sugere capacidade protetora contra a degeneração de axônios e dendritos com possíveis efeitos benéficos nas DNs (REHBACH et al., 2019).

4.2.2.3 Proteção do CAR contra a redução na expressão das proteínas do citoesqueleto induzida pela ACR

Há evidências de que a ACR causa danos às proteínas do citoesqueleto, alterando a conformação e o desempenho de suas funções. Já foi observado que essa toxina forma adutos com o neurofilamento de 68 kDa, F-actina e tubulina (MOGHE et al., 2015; NAGLE et al., 2012). Além disso, ao formar adutos com o DNA e RNA, a ACR também impede a biossíntese de novas proteínas comprometendo ainda mais o quadro degenerativo (MATVEYCHUK et al., 2011). Com base nessas premissas, analisamos o potencial protetor do CAR contra efeitos inibitórios da ACR nos componentes do citoesqueleto.

A ACR 6 μM reduziu significativamente ($0,66 \pm 0,10$) a expressão da β -III tubulina induzida pelo NGF 100 ng/mL (controle, $0,82 \pm 0,12$). Por outro lado, o tratamento com CAR ($0,82 \pm 0,11$) inibiu esse efeito, fazendo com que os valores retornassem aos níveis do controle com NGF (figura 29).

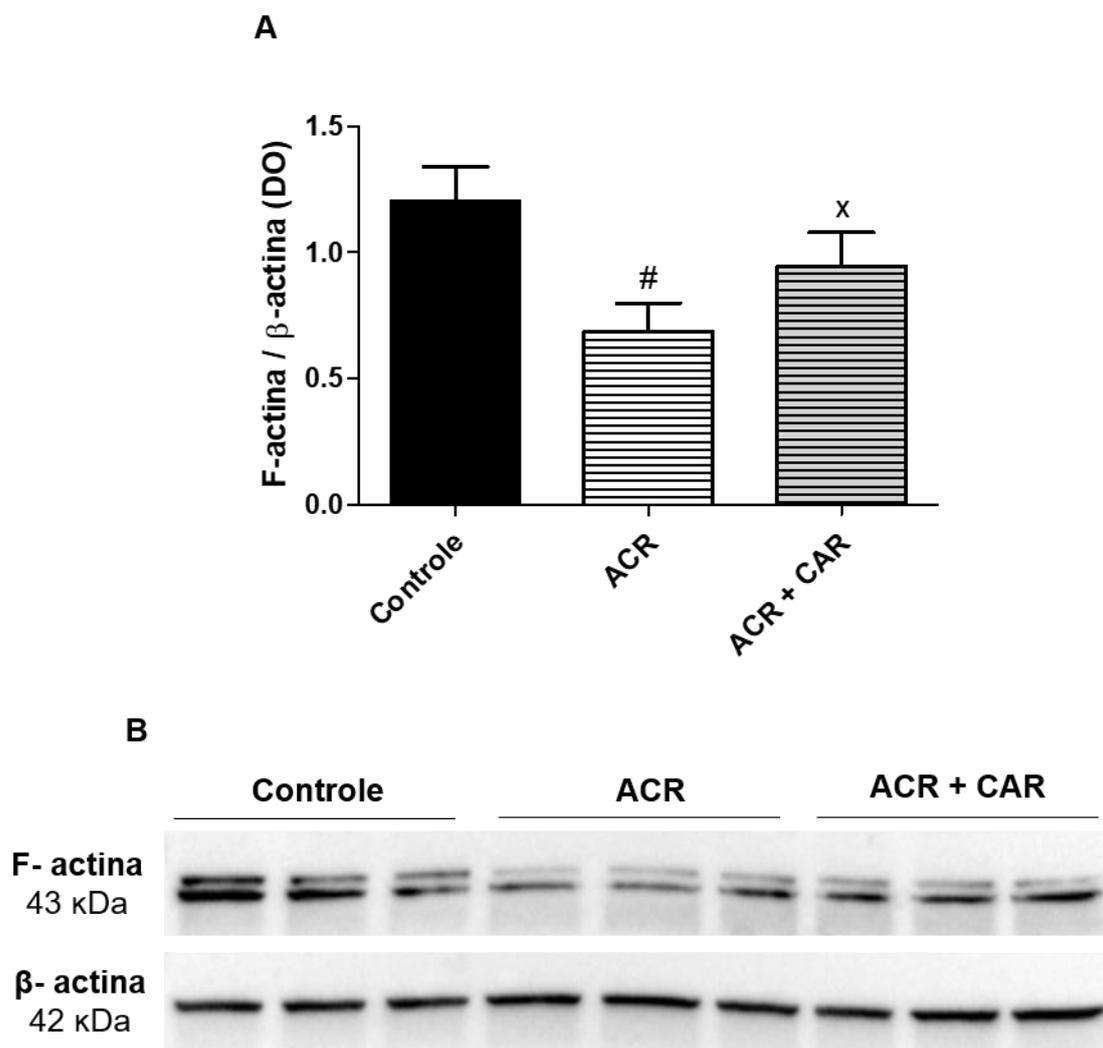
Figura 29- Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da β -III tubulina induzida pela ACR



Legenda: (A) Representação Gráfica da DO das bandas da β - III tubulina normalizada pela DO das bandas da β -actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (Controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μM (ACR); NGF 100 ng/mL , ACR 6 μM e CAR 50 μM (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B) Imagem representativa das bandas de β - III tubulina e β -actina obtidas por Western Blot.

A ACR também reduziu significativamente ($0,68 \pm 0,11$) a expressão da F-actina induzida pelo NGF 100 ng/mL (controle, $1,20 \pm 0,13$). O tratamento com CAR ($0,94 \pm 0,13$) amenizou significativamente esse efeito (figura 30).

Figura 30- Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da F-actina induzida pela ACR



Legenda: (A) Representação Gráfica da DO das bandas da F-actina normalizada pela DO das bandas da β-actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μM (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μM e CAR 50 μM (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média ± desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B) Imagem representativa das bandas de F-actina e β-actina obtidas por Western Blot.

A ACR 6 μM ($4,15 \times 10^6 \pm 0,80 \times 10^6$) reduziu a intensidade de fluorescência do NF-200 emitida pelas células PC12 em comparação ao grupo de células tratadas

apenas com NGF 100 $\eta\text{g/mL}$ ($5,88 \times 10^6 \pm 1,09 \times 10^6$). O CAR bloqueou a redução na intensidade de fluorescência do NF-200 induzida pela neurotoxina ($5,95 \times 10^6 \pm 1,19 \times 10^6$), retornando o valor ao mesmo nível do controle (NGF). Na figura 31 é possível observar, além da intensidade de fluorescência, o menor número e a menor espessura dos neuritos no grupo de células expostas à ACR em relação aos demais grupos.

Figura 31- Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão do NF-200 induzida pela ACR

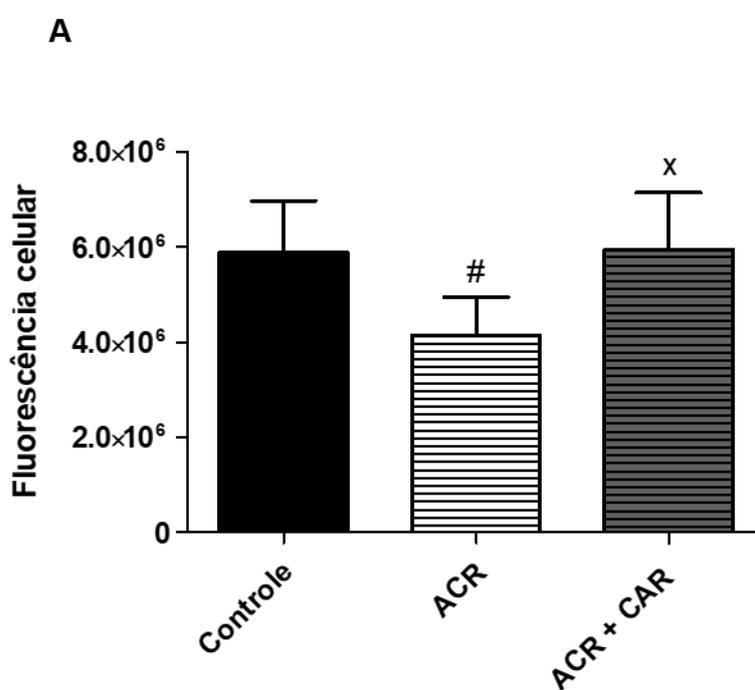
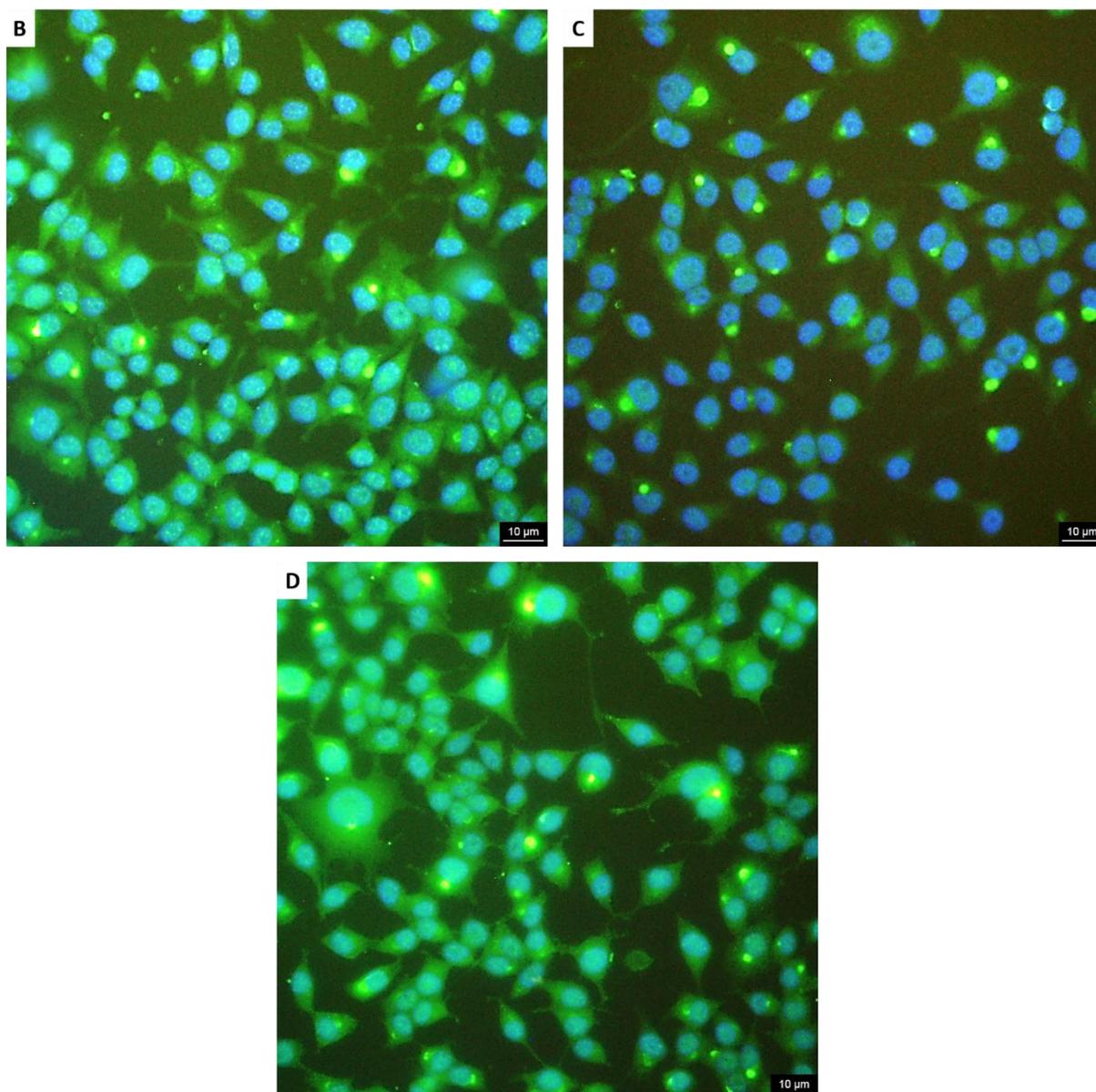


Figura 31- Continuação.



Legenda: (A) Representação gráfica da intensidade de fluorescência do NF-200 após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μM (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μM e CAR 50 μM (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B-D) Imagens sobrepostas de NF-200 conjugado com FITC (cor verde) e núcleos corados com Hoechst 33342 (cor azul) representativas dos grupos: (B) NGF 100 ng/mL, (C) NGF 100 ng/mL e ACR 6 μM e (D) NGF 100 ng/mL, ACR 6 μM e CAR 50 μM. Aumento de 40x; escala de 10 μM.

Em conjunto, os dados apresentados nas figuras 29, 30 e 31 mostram que o efeito negativo da ACR sobre a neuritogênese e diferenciação das células PC12 envolve redução de três componentes do citoesqueleto, F-actina, NF-200 e β -III tubulina. Um estudo em células Neuro2a expostas a 10 μM de ACR por 48 horas,

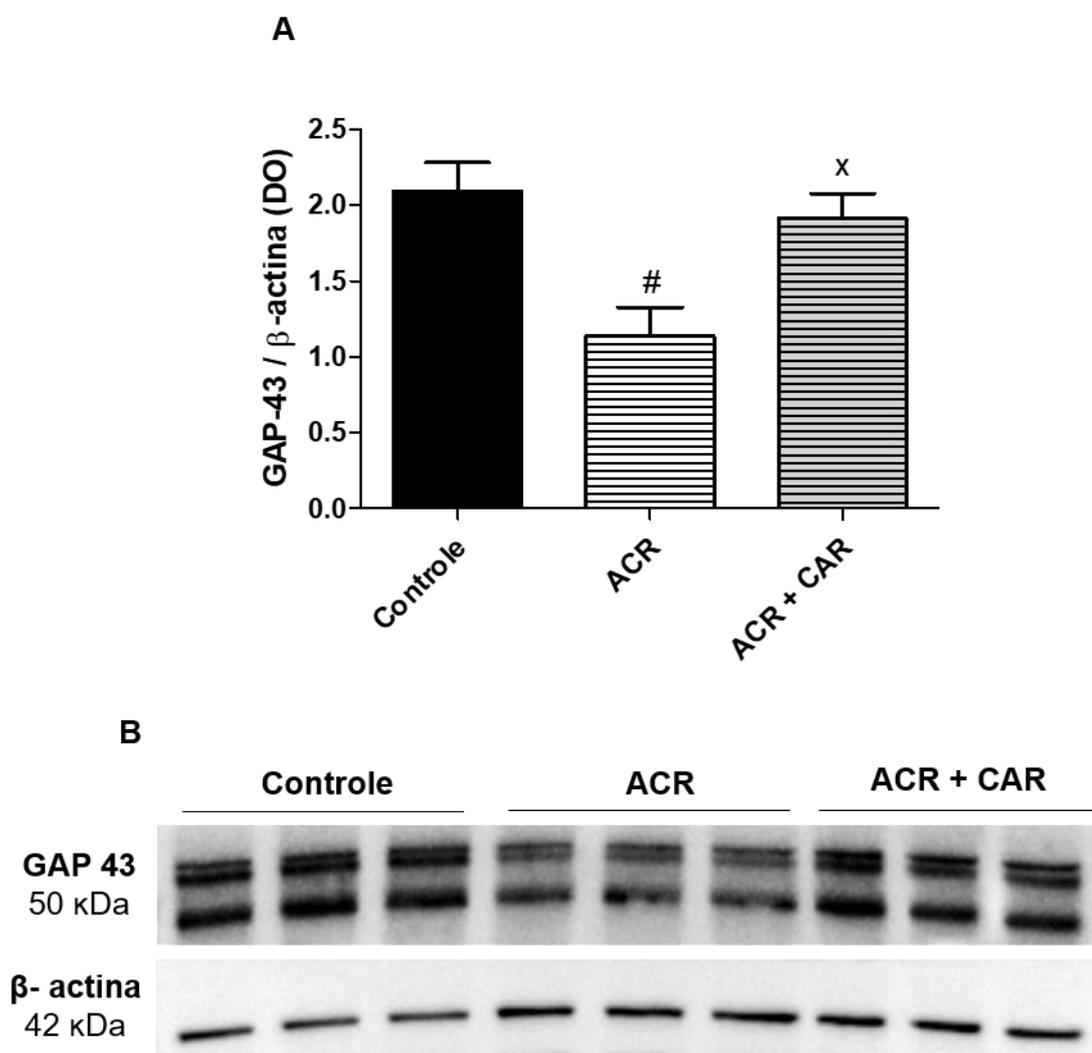
observou que a ACR se conjuga com resíduos de cisteína da actina, tubulina e vimentina (outro constituinte dos filamentos intermediários), o que altera a conformação estrutural, compromete a função e conseqüentemente resulta na degradação desses componentes (UEMURA et al., 2020). A conjugação da ACR com a tubulina ocorre no sítio de interação entre as isoformas α e β impedindo que elas se polimerizem e formem os microtúbulos, o que afeta o crescimento de dendritos no tecido cerebral (UEMURA et al., 2019). No nosso estudo, a ACR reduziu significativamente a subunidade β -III tubulina. Em ensaios *in vitro*, níveis reduzidos da β -III tubulina têm sido associados à diminuição de células expressando neuritos o que corrobora com nossos achados (TUCKER; TRAN; GONG, 2008). Do mesmo modo, a ausência dessa proteína em camundongos *knockout* compromete a formação e interação adequada dos microtúbulos e interfere no desenvolvimento dos neuritos, axônios e dendritos (SFERRA; NICITA; BERTINI, 2020). Na DP, a inibição da formação dos microtúbulos está envolvida na disfunção e fragmentação axonal, redução de sinapses e do transporte axonal de mitocôndrias (BURKE; O'MALLEY, 2013; GCWENSA et al., 2021). Adicionalmente, a inibição da expressão de neurofilamentos e anormalias no funcionamento do NF-200 também têm sido associadas à neurodegeneração (SUCHOWERSKA; FATH, 2014; YUAN et al., 2012). Assim, a capacidade de bloquear ou amenizar o efeito inibitório da ACR sobre a β -III tubulina, F-actina e NF-200 *in vitro* sugere que o CAR tem potencial protetor contra a degeneração do citoesqueleto neuronal observado nas DNs.

4.2.2.4 Proteção do CAR contra a redução na expressão da GAP-43

A proteína GAP-43 exerce papel relevante na plasticidade axonal através da orientação do crescimento e regeneração de neuritos e axônios em direção aos alvos sinápticos apropriados (KAWASAKI et al., 2018). Por essa razão, foi também objeto deste estudo.

A ACR reduziu significativamente ($1,13 \pm 0,19$) a expressão da GAP-43 induzida pelo NGF ($2,09 \pm 0,18$). Em contrapartida, o CAR reduziu significativamente esse efeito, elevando os níveis dessa proteína para $1,91 \pm 0,16$ (figura 32).

Figura 32- Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da GAP-43 induzida pela ACR



Legenda: (A) Representação gráfica da DO das bandas da GAP-43 normalizada pela DO das bandas da β -actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μ M (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μ M e CAR 50 μ M (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B) Imagem representativa das bandas de GAP-43 e β -actina obtidas por Western Blot.

A expressão da GAP-43 está fortemente correlacionada com a formação de neuritos, regeneração neuronal e regulação da endocitose e reciclagem de vesículas contendo neurotransmissores (BENOWITZ; ROUTTENBERG, 1997; HOLAHAN, 2017). Em ratos *knockout* para GAP-43, observa-se inibição da formação de memórias na região do hipocampo (MARKLUND et al., 2007). Durante a fase de regeneração neuronal após danos nas estruturas axonais, observa-se aumento nos

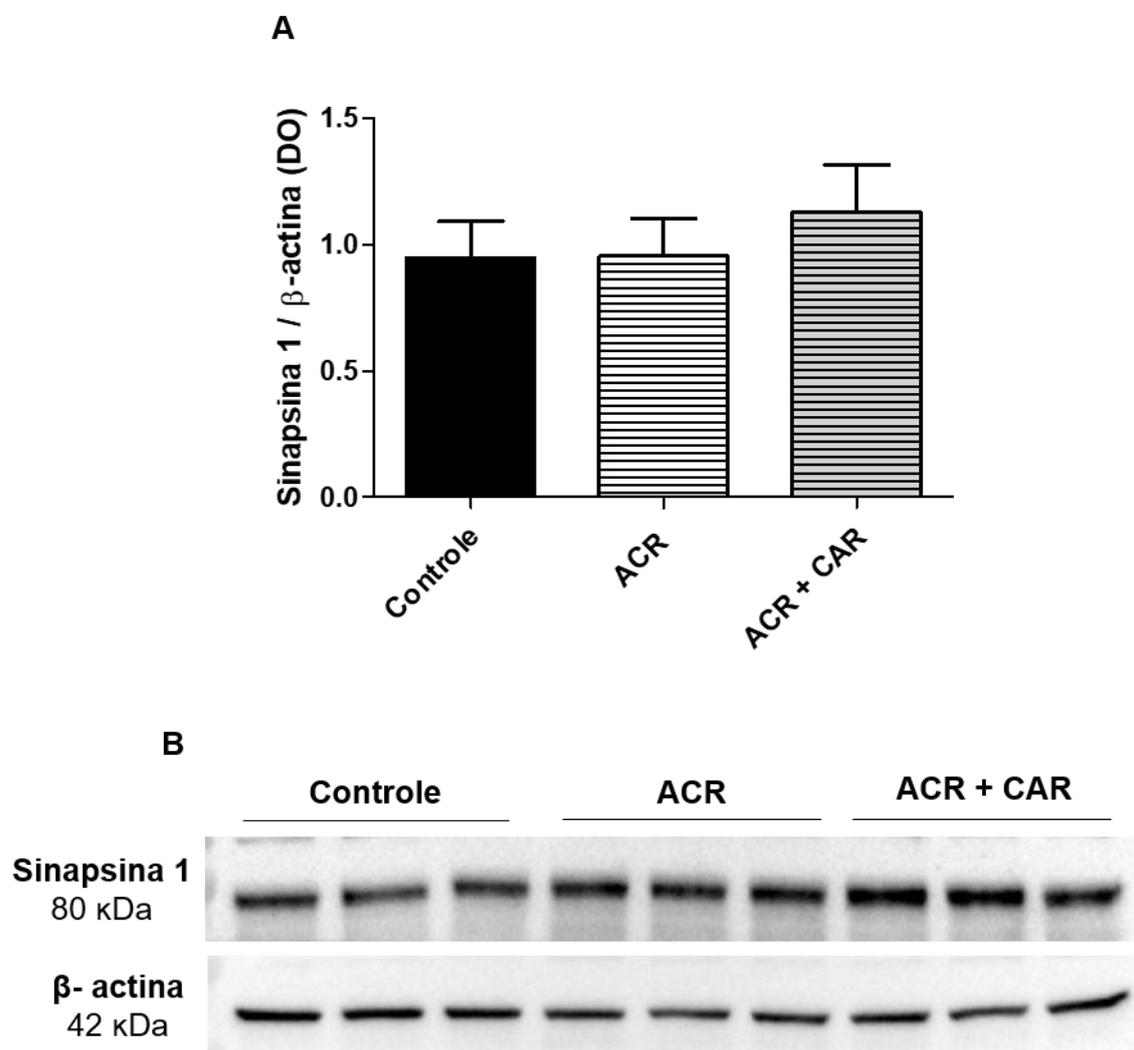
níveis da GAP-43 e de processos neuroplásticos bem como a formação de memórias, graças ao papel dessa proteína na reorganização dos terminais axonais, restabelecimento da conexão neuronal e modulação sináptica (CHUNG; SHUM; CARAVEO, 2020; DENNY, 2006). O efeito positivo do CAR sobre a expressão da GAP-43 observado em nosso estudo sugere capacidade regenerativa em um microambiente de regulação negativa induzida pela neurotoxina ACR. Em adição à GAP-43, o aumento induzido pelo CAR na expressão β -III tubulina e F-actina também são indicativos da sua capacidade regenerativa; de acordo com o estudo desenvolvido por Avwenagha e colaboradores, essas três proteínas foram expressas nos axônios de neurônios isolados da retina em regeneração após tratamento com a neurotrofina BDNF (AVWENAGHA; CAMPBELL; BIRD, 2003). Pesquisadores acreditam que a disfunção sináptica observada na DA seja mediada por alcenos do tipo 2 reativos, como a ACR e o 4-hidroxi-2-nonenal, que conjugam proteínas do terminal nervoso e provocam falhas na comunicação neuronal antes da degeneração e morte dos neurônios (LOPACHIN; GAVIN; BARBER, 2008).

4.2.2.5 Efeito da ACR e do CAR na expressão de proteínas associadas a vesículas sinápticas

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a ACR ataca e inibe proteínas que regulam a fusão das vesículas sinápticas com a membrana do terminal nervoso, como a NSF (proteína de fusão sensível à N-etilmaleimida) e SNAP-25 (proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma), reduzindo a liberação, recaptação e armazenamento de neurotransmissores (MOGHE et al., 2015; POCERNICH et al., 2001). No presente estudo, investigamos o efeito da ACR e o efeito protetor do CAR na expressão das proteínas sinápticas, sinapsina 1 e sinaptofisina.

A ACR 6 μ M não alterou significativamente ($0,95 \pm 0,15$) a expressão da sinapsina 1 induzida pelo NGF (controle, $0,94 \pm 0,14$). Embora por si só o CAR aumente a expressão da sinapsina 1 em células PC12 como demonstrado anteriormente na figura 19, em células tratadas com ACR, o tratamento com CAR ($1,12 \pm 0,18$) não teve nenhum efeito positivo na expressão da sinapsina 1 (figura 33).

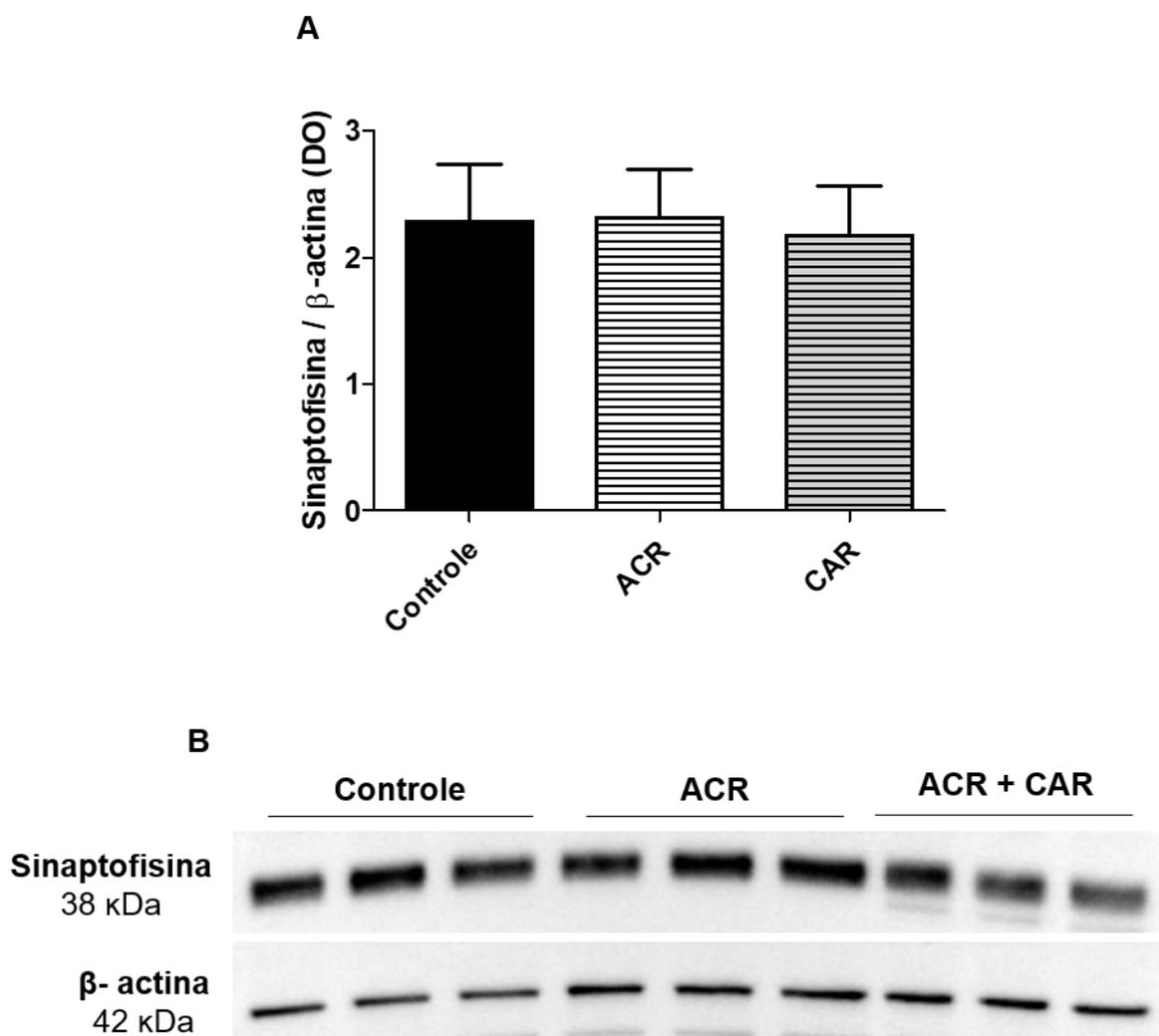
Figura 33- ACR e CAR não interferem na expressão da sinapsina 1



Legenda: (A) Representação gráfica da DO das bandas da sinapsina 1 normalizada pela DO das bandas da β -actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μ M (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μ M e CAR 50 μ M (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B) Imagem representativa das bandas de sinapsina 1 e β -actina obtidas por Western Blot.

Da mesma forma que para a sinapsina 1, nem a ACR ($2,31 \pm 0,37$), nem o CAR ($2,17 \pm 0,39$) alteraram significativamente a expressão da sinaptofisina induzida pelo NGF ($2,28 \pm 0,45$), como apresentado na figura 34. Contrariamente à regulação positiva da sinapsina 1, o CAR por si só não exerce nenhum efeito sobre a expressão da sinaptofisina, como apresentado anteriormente na figura 20.

Figura 34- ACR e CAR não interferem na expressão da sinaptofisina



Legenda: (A) Representação gráfica da DO das bandas da sinaptofisina normalizada pela DO das bandas da β -actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μ M (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μ M e CAR 50 μ M (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B) Imagem representativa das bandas de sinaptofisina e β -actina obtidas por Western Blot.

Os resultados apresentados nas figuras 33 e 34 mostram que a modulação negativa da ACR sobre a diferenciação das células PC12 induzida pelo NGF não é acompanhada de alterações na expressão das proteínas sinapsina 1 e sinaptofisina. É possível que a ação da ACR sobre essas proteínas ocorra somente após um período mais longo de incubação ou em concentrações superiores às analisadas. De acordo com o estudo de (LOPACHIN et al., 2007), os efeitos negativos da ACR em sinaptossomas (terminais sinápticos) isolados do cérebro de ratos, mais

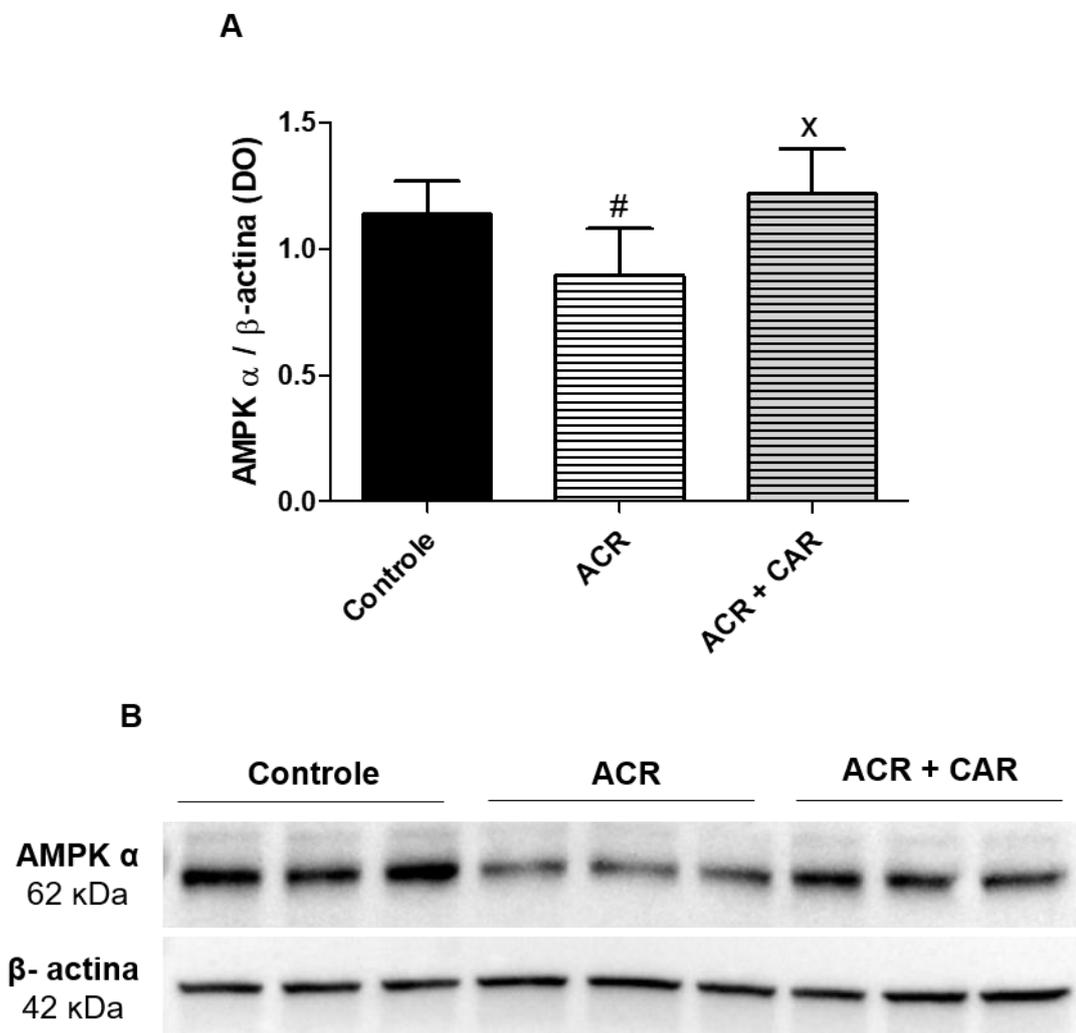
especificamente na liberação, recaptação e armazenamento do neurotransmissor dopamina, ocorreu em concentrações a partir de 50 μ M.

4.2.3 Ensaios de bioenergética

As falhas no fornecimento energético também tem papel relevante na disfunção e degeneração neuronal (CUNNANE et al., 2020; VENKATESAN; JI; KIM, 2015). Há evidências de que a ACR exerce efeito negativo sobre a bioenergética celular, pois reduz a expressão e a atividade da AMPK, inibe enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e reduz a produção de ATP (LU et al., 2017; LUO; ROBINSON; SHI, 2005). Neste estudo, investigamos o envolvimento das proteínas AMPK e SIRT1 (biosensores do estado energético celular) na neurotoxicidade da ACR e no efeito neuroprotetor do CAR.

Observamos que a ACR reduziu ($0,89 \pm 0,18$) a expressão da AMPK α em células PC12 estimuladas com NGF ($1,13 \pm 0,13$) e que a presença do CAR inibiu significativamente esse efeito ($1,21 \pm 0,17$), retornando a expressão da AMPK α aos níveis do controle (figura 35).

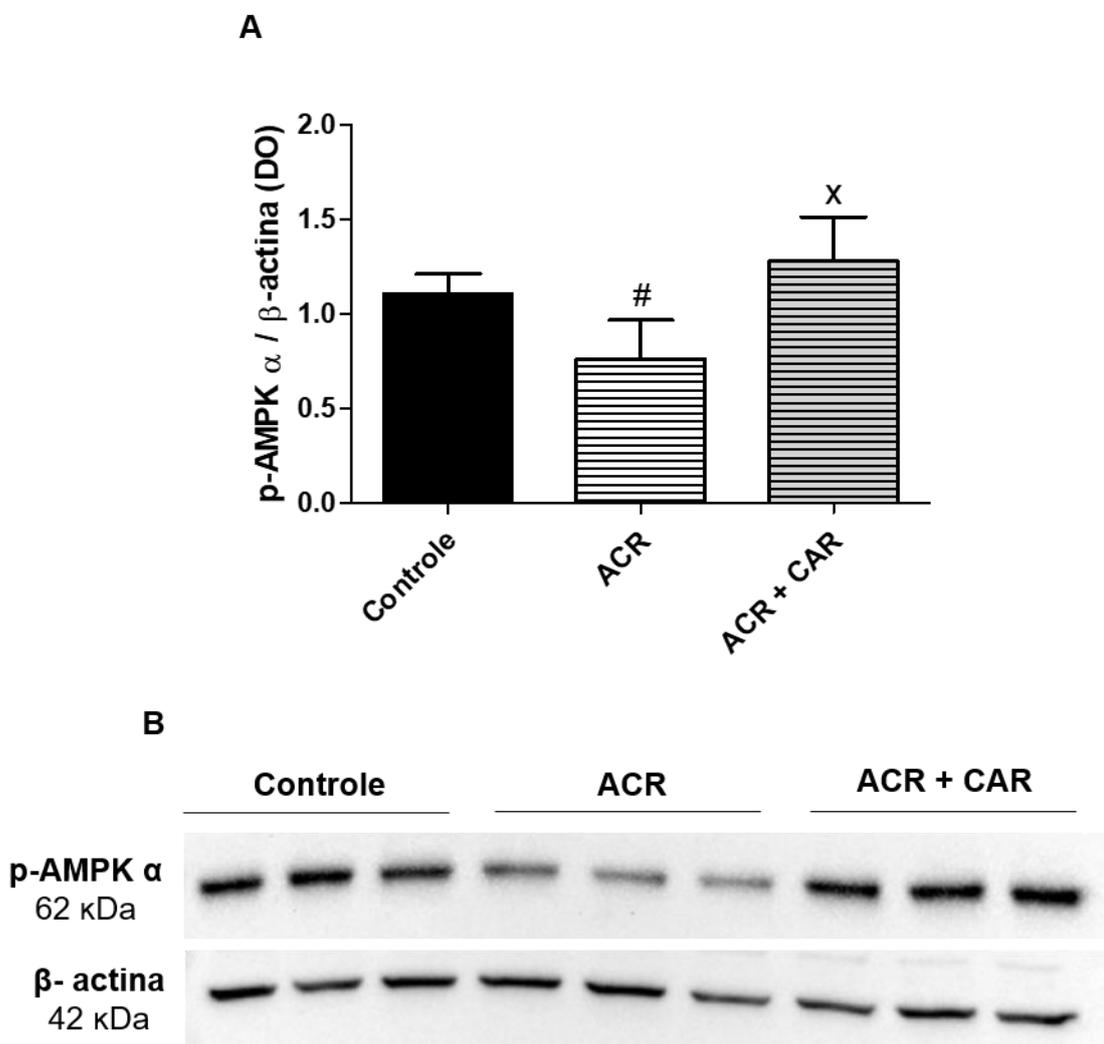
Figura 35- Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da AMPK α induzida pela ACR



Legenda: (A) Representação gráfica da DO das bandas da AMPK α normalizada pela DO das bandas da β -actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μ M (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μ M e CAR 50 μ M (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B) Imagem representativa das bandas de AMPK α e β -actina obtidas por Western Blot.

Do mesmo modo, a ACR ($0,76 \pm 0,20$) também reduziu a expressão da p-AMPK α (forma ativada da AMPK α) em relação ao grupo controle tratado com NGF ($1,10 \pm 0,10$). O tratamento com CAR ($1,27 \pm 0,23$) também bloqueou este efeito da ACR (figura 36).

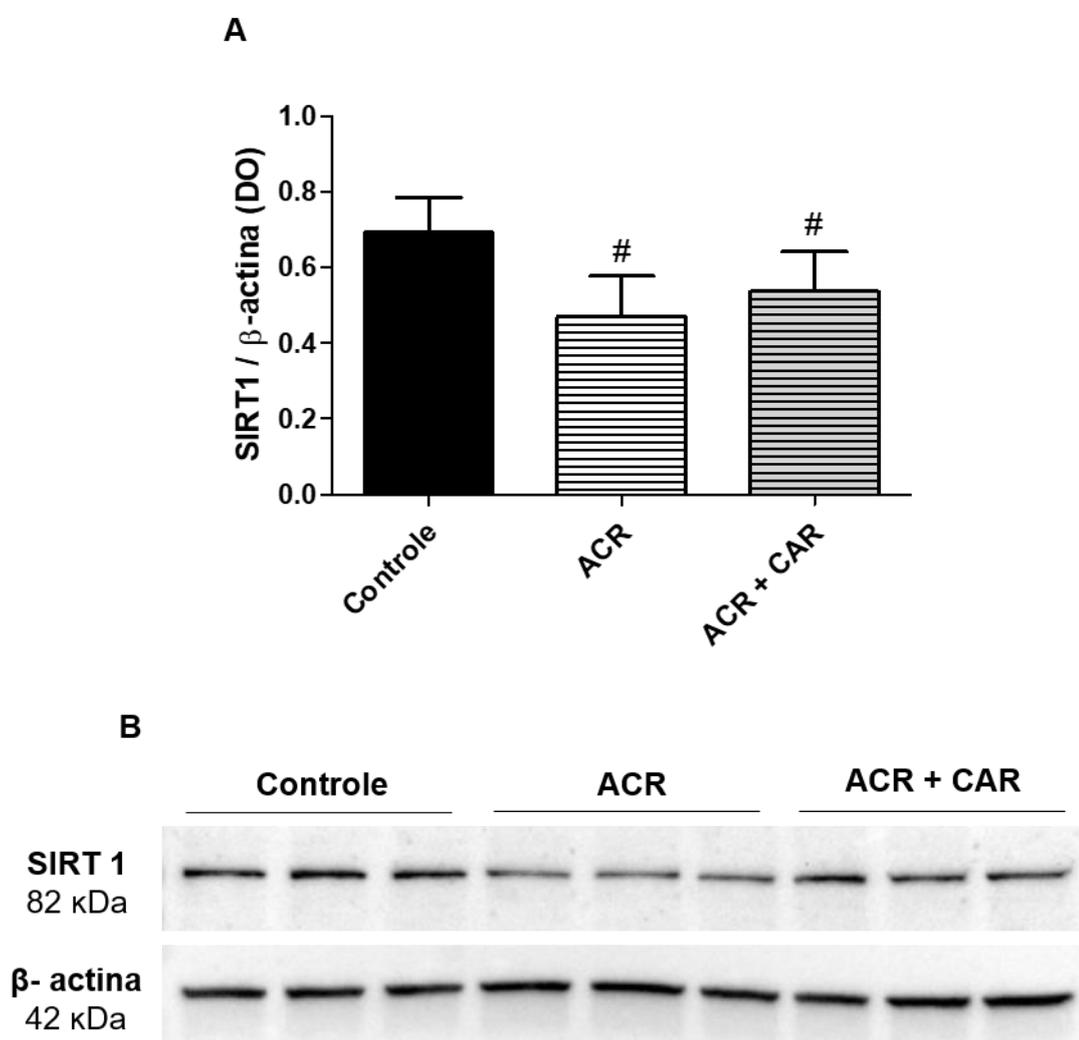
Figura 36- Efeito protetor do CAR contra a redução na expressão da p-AMPK α induzida pela ACR



Legenda: (A) Representação gráfica da DO das bands da AMPK α fosforilada (p-AMPK α) normalizada pela DO das bandas da β -actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μ M (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μ M e CAR 50 μ M (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle; x Significativamente diferente em relação à ACR. (B) Imagem representativa das bandas de p-AMPK α e β -actina obtidas por Western Blot.

A ACR ($0,47 \pm 0,10$) também reduziu significativamente a expressão da SIRT 1 induzida pelo NGF ($0,69 \pm 0,09$). A presença do CAR ($0,53 \pm 0,10$) não protegeu contra esse efeito (figura 37).

Figura 37- CAR não protege contra a redução da SIRT 1 induzida pela ACR



Legenda: (A) Representação gráfica da DO das bandas da SIRT1 normalizada pela DO das bandas da β -actina após tratamento de células PC12 com: NGF 100 ng/mL (controle); NGF 100 ng/mL e ACR 6 μ M (ACR); NGF 100 ng/mL, ACR 6 μ M e CAR 50 μ M (ACR + CAR) por 72 horas. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. # Significativamente diferente em relação ao controle. Não houve diferença significativa entre os grupos ACR + CAR e ACR. (B) Imagem representativa das bandas de SIRT1 e β -actina obtidas por Western Blot. Controle: NGF 100 ng/mL; ACR: NGF 100 ng/mL e ACR 6 μ M; ACR + CAR: NGF 100 ng/mL, ACR 6 μ M e CAR 50 μ M.

No cérebro de indivíduos acometidos pela DA, observa-se reduzida expressão da SIRT1 e reduzida atividade da AMPK α (DONG et al., 2016), além de elevadas concentrações de ACR, produto da peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo presente nas DNs (DANG et al., 2010). Os resultados obtidos em

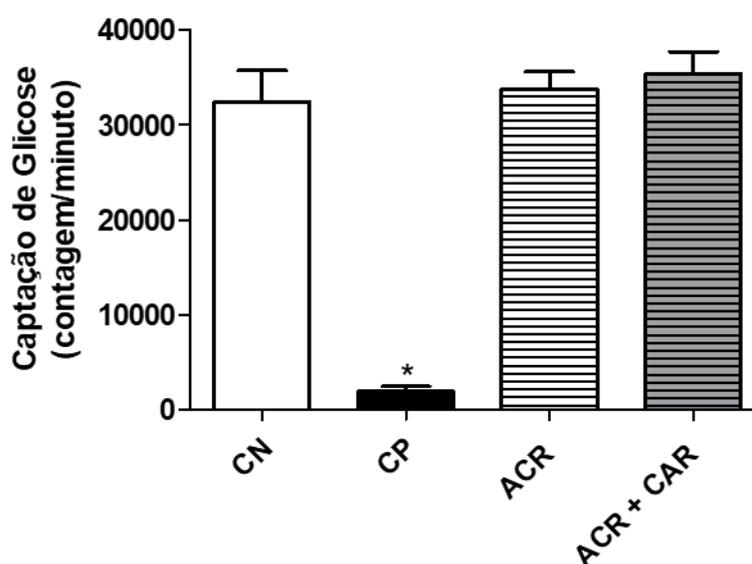
nosso estudo sugerem o envolvimento da ACR nestes efeitos. Reduzida expressão da AMPK α tem sido associada a falhas no metabolismo bioenergético, o que pode comprometer a capacidade neuroplástica e regenerativa das células neuronais (HERZIG; SHAW, 2018). De fato, animais *knockout* para essa proteína apresentaram menor diferenciação de neurônios do hipocampo, enquanto a redução da atividade da AMPK α foi associada à progressiva neurodegeneração (MARTORANA et al., 2018; TSCHÄPE et al., 2002). No presente estudo, observamos que a ACR interfere na expressão e atividade da AMPK α promovida pela neurotrofina NGF, o que ajuda a explicar a inibição da diferenciação das células PC12 e degeneração neuronal *in vivo*. Por outro lado, o fitoquímico CAR evitou a regulação negativa da ACR sobre a AMPK, sugerindo efeito protetor contra disfunções no metabolismo energético e, por conseguinte, contra a neurodegeneração associada à esta neurotoxina.

Também observamos que a ACR interfere na expressão da SIRT1 induzida pelo NGF, o que pode contribuir tanto para a supressão do metabolismo energético quanto para a inibição da formação de neuritos, visto que o silenciamento dessa proteína em células PC12 inibe a neuritogênese estimulada pelo NGF (SUGINO et al., 2010). Assim como a SIRT1, estudos anteriores também mostraram efeito negativo da ACR sobre a SIRT3 o que resultou em disfunção mitocondrial e estresse oxidativo no retículo endoplasmático (HUANG et al., 2016; QU et al., 2018). Como a SIRT3 também possui importante papel na neuroplasticidade adaptativa, sua redução pela ACR também pode contribuir para a diminuição da neuritogênese e diferenciação celular (RAEFSKY; MATTSON, 2017). A redução desses sensores energéticos pela ACR pode ocorrer tanto diretamente pelo ataque ao DNA e proteínas, quanto indiretamente, através da formação de EROs pois já foi observado que as EROs também suprimem a via SIRT1/LKB1/AMPK (WANG et al., 2010).

A redução da AMPK e SIRT1 pela ACR pode afetar a biogênese mitocondrial, expressão dos transportadores GLUT, captação de glicose e ativação das vias produtoras de ATP. Estudos relataram que a ACR reduz a biossíntese de ATP em diferentes modelos, incluindo modelo neuronal com células PC12 (LUO; ROBINSON; SHI, 2005; NAKAMURA et al., 2013). Foi observada redução da síntese de ATP já após 24h de tratamento com ACR 1, 10 e 100 μ M (LUO; ROBINSON; SHI, 2005). No entanto, não foi investigado se esse efeito resulta da interferência da ACR na captação de glicose pelas células. Nosso estudo mostrou que a ACR 6 μ M (33776 ± 1816) não alterou a captação intracelular de glicose nas células PC12 após 72 horas

em relação ao controle sem tratamento (32393 ± 3371). Foi usada citocalasina B, inibidor dos transportadores de glicose, como controle positivo, que reduziu de maneira eficaz a captação da glicose ($1905 \pm 519,1$). O tratamento das células com CAR não resultou (35358 ± 2373) em alterações significativas na captação de glicose (figura 38).

Figura 38- ACR e CAR não alteram a captação de glicose



Legenda: Captação de glicose marcada com radionuclídeo trício (deoxi-D-glicose, 2-[1,2-3H(N)]) pelas células PC12 após 72 horas de tratamento: CN: controle negativo (células sem tratamento); CP: controle positivo (Citocalasina B 10 μ M); ACR: acroleína 6 μ M; ACR + CAR: ACR 6 μ M e CAR 12,5 μ M. A radioatividade foi detectada em contador de cintilação líquida Microbeta 1450 LSC Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA) e expressa em contagem por minuto. Os valores obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas foram expressos como média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente em relação ao CN.

Curiosamente, a modulação negativa dos sensores AMPK e SIRT1 pela ACR observada em nosso estudo foi associada à redução do ATP, mas não a alterações na captação de glicose. Sabe-se que a redução e inibição da AMPK α interferem na translocação de transportadores GLUT para a membrana celular com reflexos negativos na captação de glicose do ambiente extracelular para o intracelular. Por outro lado, sabe-se também que o AMPK pode aumentar o fornecimento de energia celular por outras vias, como a liberação da glicose dos estoques de glicogênio (CURRY et al., 2018). A redução nos níveis de ATP envolve outros

mecanismos além da reduzida captação de glicose, como a inibição de enzimas do Ciclo do ácido cítrico (ex: isocitrato desidrogenase e alfacetoglutatarato desidrogenase) da cadeia respiratória mitocondrial (ex: complexos I e IV) (LUO; ROBINSON; SHI, 2005; NAKAMURA et al., 2013; PICKLO; MONTINE, 2001).

5. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o potencial neurotrófico do fitoquímico CAR. O mecanismo de ação neurotrófica do CAR envolve ativação do receptor TrkA, ativação das vias MAPK/ERK e PI3K/Akt, aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto (β -III tubulina, F-actina, NF-200) e de proteínas associadas ao crescimento axonal (GAP-43) e à comunicação sináptica (sinapsina 1). Esses efeitos foram acompanhados da modulação positiva do metabolismo bioenergético através da ativação da via AMPK/p-AMPK e aumento da biossíntese de ATP, essenciais para sustentar a alta demanda energética neuronal particularmente relacionados à neuroplasticidade axonal e sináptica. Adicionalmente, o estudo demonstra o efeito protetor do CAR contra a modulação negativa induzida pela ACR na diferenciação celular promovida pelo NGF, mais especificamente na expressão de proteínas do citoesqueleto e de crescimento axonal e na atividade do sensor bioenergético AMPK α .

Este estudo fornece uma nova perspectiva sobre o potencial terapêutico do fitoquímico CAR contra as DNs ao sugerir uma ação que mimetiza a ação neurotrófica do NGF além de efeitos benéficos na homeostase energética, eventos associados à neuroplasticidade axonal e restabelecimento de conexões efetivas entre as células neuronais. Estudos adicionais são necessários para melhor elucidação deste potencial.

6. Sugestões para trabalhos futuros

Para melhor elucidação do potencial neurotrófico e protetor do CAR contra a neurodegeneração associada a DNs, trabalhos futuros poderiam investigar outros possíveis mecanismos da ação neurotrófica do CAR, como por exemplo, a ativação do receptor seletivo para o fator neurotrófico BDNF (TrkB) e a indução da expressão dos fatores neurotróficos BDNF e Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF), que também exercem efeitos cruciais na sobrevivência, diferenciação e regeneração neuronal.

Adicionalmente, a capacidade do fitoquímico CAR induzir plasticidade axonal e sináptica e assim, de restabelecer novas conexões neuronais, poderia também ser avaliada em modelo *in vivo*, nas principais regiões afetadas nas DNs como o hipocampo, a substância negra e o estriado, através da análise de marcadores neurotípicos pelas técnicas de PCR, Western Blot e Imunohistoquímica. Mais ainda, poderia ser explorado nesse modelo, o potencial do CAR regenerar o tecido neuronal lesionado pela neurotoxina ACR.

7. Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. **O que é Alzheimer**. Disponível em: <https://abraz.org.br/2020/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer-2/>. Acesso em: 02 ago. 2021.

2020 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, Mar 10 2020.

ABD RASHED, A.; ABD RAHMAN, A. Z.; RATHI, D. N. G. Essential Oils as a Potential Neuroprotective Remedy for Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Review. **Molecules**, 26, n. 4, Feb 19 2021.

ABDUL MUNEER, P. M.; ALIKUNJU, S.; SZLACHETKA, A. M.; MERCER, A. J. *et al.* Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, 3, n. 1, p. 48-56, 2011.

ALETTA, J. M. Phosphorylation of type III beta-tubulin PC12 cell neurites during NGF-induced process outgrowth. **J Neurobiol**, 31, n. 4, p. 461-475, Dec 1996.

ALLEN, S. J.; WATSON, J. J.; DAWBARN, D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. **Curr Neuropharmacol**, 9, n. 4, p. 559-573, Dec 2011.

AMARAL, L. D.; SANTOS, N. A. G. D.; SISTI, F. M.; DEL BEL, E. *et al.* The antibiotic doxycycline mimics the NGF signaling in PC12 cells: A relevant mechanism for neuroprotection. **Chem Biol Interact**, 341, p. 109454, May 25 2021.

AMATO, S.; MAN, H. Y. AMPK signaling in neuronal polarization: Putting the brakes on axonal traffic of PI3-Kinase. **Commun Integr Biol**, 5, n. 2, p. 152-155, Mar 01 2012.

AMBAW, A.; ZHENG, L.; TAMBE, M. A.; STRATHEARN, K. E. *et al.* Acrolein-mediated neuronal cell death and alpha-synuclein aggregation: Implications for Parkinson's disease. **Mol Cell Neurosci**, 88, p. 70-82, 04 2018.

AMINZADEH, A.; SALARINEJAD, A. Effects of myricetin against cadmium-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Toxicol Res (Camb)**, 10, n. 1, p. 84-90, Jan 2021.

ANGELOVA, P. R.; ESTERAS, N.; ABRAMOV, A. Y. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. **Med Res Rev**, 41, n. 2, p. 770-784, 03 2021.

ANSARI, M. A.; ROBERTS, K. N.; SCHEFF, S. W. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. **Free Radic Biol Med**, 45, n. 4, p. 443-452, Aug 15 2008.

ARAKI, T.; SASAKI, Y.; MILBRANDT, J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. **Science**, 305, n. 5686, p. 1010-1013, Aug 13 2004.

ARÉVALO, J. C.; WU, S. H. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! **Cell Mol Life Sci**, 63, n. 13, p. 1523-1537, Jul 2006.

ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. **Nat Rev Neurol**, 11, n. 1, p. 25-40, Jan 2015.

AVWENAGHA, O.; CAMPBELL, G.; BIRD, M. M. Distribution of GAP-43, beta-III tubulin and F-actin in developing and regenerating axons and their growth cones in vitro, following neurotrophin treatment. **J Neurocytol**, 32, n. 9, p. 1077-1089, Nov 2003.

AZIZI, Z.; EBRAHIMI, S.; SAADATFAR, E.; KAMALINEJAD, M. *et al.* Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia. **Behav Pharmacol**, 23, n. 3, p. 241-249, Jun 2012.

AZIZI, Z.; SALIMI, M.; AMANZADEH, A.; MAJELSSI, N. *et al.* Carvacrol and Thymol Attenuate Cytotoxicity Induced by Amyloid β 25-35 via Activating Protein Kinase C and Inhibiting Oxidative Stress in PC12 Cells. **Iran Biomed J**, 24, n. 4, p. 243-250, 07 2020.

BAE, C. Y. J. **Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel Affects Neurite Outgrowth of Hippocampal Neurons in vitro**. 2012b. 89 f. (Master of Science) -, Department of Physiology, University of Toronto, Toronto

BAGLI, E.; GOUSSIA, A.; MOSCHOS, M. M.; AGNANTIS, N. *et al.* Natural Compounds and Neuroprotection: Mechanisms of Action and Novel Delivery Systems. **In Vivo**, 30, n. 5, p. 535-547, 2016 09-10 2016.

BANIK, S.; AKTER, M.; CORPUS BONDAD, S. E.; SAITO, T. *et al.* Carvacrol inhibits cadmium toxicity through combating against caspase dependent/independent apoptosis in PC12 cells. **Food Chem Toxicol**, 134, p. 110835, Dec 2019.

BARATASHVILI, A.; JAVAKHISHVILI, E.; TARKHNISHVILI, E.; KVANTIDZE, I. Carvacrol and Voluntary Exercise Improved Molecular profile in Hippocampus of Male Rats Nourished with High-Fat Diet. **GMJ Medicine**, 2, n. 1, p. 88-94, 2018.

BARTUS, R. T.; JOHNSON, E. M. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? **Neurobiol Dis**, 97, n. Pt B, p. 156-168, 01 2017.

BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Curr Pharm Des**, 14, n. 29, p. 3106-3119, 2008.

BECHER, A.; DRENCKHAHN, A.; PAHNER, I.; MARGITTAI, M. *et al.* The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. **J Neurosci**, 19, n. 6, p. 1922-1931, Mar 15 1999.

BENNISON, S. A.; BLAZEJEWSKI, S. M.; SMITH, T. H.; TOYO-OKA, K. Protein kinases: master regulators of neuritogenesis and therapeutic targets for axon regeneration. **Cell Mol Life Sci**, 77, n. 8, p. 1511-1530, Apr 2020.

BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends Neurosci**, 20, n. 2, p. 84-91, Feb 1997.

BERNARDES, C. P.; SANTOS, N. A. G.; SISTI, F. M.; FERREIRA, R. S. *et al.* A synthetic snake-venom-based tripeptide (Glu-Val-Trp) protects PC12 cells from MPP. **Peptides**, 104, p. 24-34, 06 2018.

BOSSY-WETZEL, E.; SCHWARZENBACHER, R.; LIPTON, S. A. Molecular pathways to neurodegeneration. **Nat Med**, 10 Suppl, p. S2-9, Jul 2004.

BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A. C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein (Sao Paulo)**, 14, n. 3, p. 7-9, 2016 Jul-Sep 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 07 1976.

BURCHAM, P. C. Acrolein and Human Disease: Untangling the Knotty Exposure Scenarios Accompanying Several Diverse Disorders. **Chem Res Toxicol**, 30, n. 1, p. 145-161, 01 17 2017.

BURKE, R. E.; O'MALLEY, K. Axon degeneration in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, 246, p. 72-83, Aug 2013.

CALABRESE, E. J. Enhancing and regulating neurite outgrowth. **Crit Rev Toxicol**, 38, n. 4, p. 391-418, 2008.

CALHOUN, M. E.; JUCKER, M.; MARTIN, L. J.; THINAKARAN, G. *et al.* Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. **J Neurocytol**, 25, n. 12, p. 821-828, Dec 1996.

CALINGASAN, N. Y.; UCHIDA, K.; GIBSON, G. E. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, 72, n. 2, p. 751-756, Feb 1999.

CAMPOREZ, D.; BELCAVELLO, L.; ALMEIDA, J. F. F.; SILVA-SENA, G. G. *et al.* Positive association of a Sirt1 variant and parameters of oxidative stress on Alzheimer's disease. **Neurol Sci**, 42, n. 5, p. 1843-1851, May 2021.

CASTALDO, M.; ZOLLO, C.; ESPOSITO, G.; AMMENDOLA, R. *et al.* NOX2-Dependent Reactive Oxygen Species Regulate Formyl-Peptide Receptor 1-Mediated TrkA Transactivation in SH-SY5Y Cells. **Oxid Med Cell Longev**, 2019, p. 2051235, 2019.

CASTELLI, V.; BENEDETTI, E.; ANTONOSANTE, A.; CATANESI, M. *et al.* Neuronal Cells Rearrangement During Aging and Neurodegenerative Disease: Metabolism, Oxidative Stress and Organelles Dynamic. **Front Mol Neurosci**, 12, p. 132, 2019.

CASTRÉN, E.; ANTILA, H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. **Mol Psychiatry**, 22, n. 8, p. 1085-1095, 08 2017.

CETRULLO, S.; D'ADAMO, S.; TANTINI, B.; BORZI, R. M. *et al.* mTOR, AMPK, and Sirt1: Key Players in Metabolic Stress Management. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, 25, n. 1, p. 59-75, 2015.

CHAURASIYA, N. D.; SHUKLA, S.; TEKWANI, B. L. A Combined In Vitro Assay for Evaluation of Neurotrophic Activity and Cytotoxicity. **SLAS Discov**, 22, n. 6, p. 667-675, 07 2017.

CHEN, C. H.; JOSHI, A. U.; MOCHLY-ROSEN, D. The Role of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2) in Neuropathology and Neurodegeneration. **Acta Neurol Taiwan**, 25(4), p. 111-123, Dec 15 2016.

CHENET, A. L.; DUARTE, A. R.; DE ALMEIDA, F. J. S.; ANDRADE, C. M. B. *et al.* Carvacrol Depends on Heme Oxygenase-1 (HO-1) to Exert Antioxidant, Anti-inflammatory, and Mitochondria-Related Protection in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Line Exposed to Hydrogen Peroxide. **Neurochem Res**, 44, n. 4, p. 884-896, Apr 2019.

CHENG, A.; HOU, Y.; MATTSON, M. P. Mitochondria and neuroplasticity. **ASN Neuro**, 2, n. 5, p. e00045, Oct 04 2010.

CHO, T.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Neurofilament 200 as an indicator of differences between mipafox and paraoxon sensitivity in Sy5Y neuroblastoma cells. **J Toxicol Environ Health A**, 67, n. 13, p. 987-1000, Jul 09 2004.

CHUN, Y. L.; KIM, M.; KIM, Y. H.; KIM, N. *et al.* Carvacrol effectively protects demyelination by suppressing transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) in Schwann cells. **Anat Sci Int**, 95, n. 2, p. 230-239, Mar 2020.

CHUNG, D.; SHUM, A.; CARAVEO, G. GAP-43 and BASP1 in Axon Regeneration: Implications for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Front Cell Dev Biol**, 8, p. 567537, 2020.

CLIFT-O'GRADY, L.; LINSTEDT, A. D.; LOWE, A. W.; GROTE, E. *et al.* Biogenesis of synaptic vesicle-like structures in a pheochromocytoma cell line PC-12. **J Cell Biol**, 110, n. 5, p. 1693-1703, May 1990.

COLANGELO, A. M.; CIRILLO, G.; ALBERGHINA, L.; PAPA, M. *et al.* Neural plasticity and adult neurogenesis: the deep biology perspective. **Neural Regen Res**, 14, n. 2, p. 201-205, Feb 2019.

COLLABORATORS, G. N. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol**, 18, n. 5, p. 459-480, 05 2019.

CONTI, A. M.; BRIMIJOIN, S.; MILLER, L. J.; WINDEBANK, A. J. Suppression of neurite outgrowth by high-dose nerve growth factor is independent of functional p75NTR receptors. **Neurobiol Dis**, 15, n. 1, p. 106-114, Feb 2004.

CRAMER, S. C.; SUR, M.; DOBKIN, B. H.; O'BRIEN, C. *et al.* Harnessing neuroplasticity for clinical applications. **Brain**, 134, n. Pt 6, p. 1591-1609, Jun 2011.

CROUS-BOU, M.; MINGUILLÓN, C.; GRAMUNT, N.; MOLINUEVO, J. L. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. **Alzheimers Res Ther**, 9, n. 1, p. 71, Sep 12 2017.

CRUZ-VICENTE, P.; PASSARINHA, L. A.; SILVESTRE, S.; GALLARDO, E. Recent Developments in New Therapeutic Agents against Alzheimer and Parkinson Diseases: In-Silico Approaches. **Molecules**, 26, n. 8, Apr 11 2021.

CUMMINGS, J.; LEE, G.; RITTER, A.; SABBAGH, M. *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. **Alzheimers Dement (N Y)**, 6, n. 1, p. e12050, 2020.

CUNNANE, S. C.; TRUSHINA, E.; MORLAND, C.; PRIGIONE, A. *et al.* Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. **Nat Rev Drug Discov**, 19, n. 9, p. 609-633, 09 2020.

CURRY, D. W.; STUTZ, B.; ANDREWS, Z. B.; ELSWORTH, J. D. Targeting AMPK Signaling as a Neuroprotective Strategy in Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis**, 8, n. 2, p. 161-181, 2018.

DA SILVA, J. S.; DOTTI, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nat Rev Neurosci**, 3, n. 9, p. 694-704, Sep 2002.

DANG, T. N.; ARSENEAULT, M.; MURTHY, V.; RAMASSAMY, C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. **Curr Mol Pharmacol**, 3, n. 2, p. 66-78, Jun 2010.

DANG, T. N.; ARSENEAULT, M.; ZARKOVIC, N.; WAEG, G. *et al.* Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, 21, n. 4, p. 1197-1216, 2010.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. **Neurotoxicol Teratol**, 26, n. 3, p. 397-406, 2004 May-Jun 2004.

DASGUPTA, B.; MILBRANDT, J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 17, p. 7217-7222, Apr 24 2007.

DE LA MONTE, S. M.; NEELY, T. R.; CANNON, J.; WANDS, J. R. Oxidative stress and hypoxia-like injury cause Alzheimer-type molecular abnormalities in central nervous system neurons. **Cell Mol Life Sci**, 57, n. 10, p. 1471-1481, Sep 2000.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, 75, n. 7-8, p. 801-804, Dec 2004.

DELGADO-MARÍN, L.; SÁNCHEZ-BORZONE, M.; GARCÍA, D. A. Neuroprotective effects of gabaergic phenols correlated with their pharmacological and antioxidant properties. **Life Sci**, 175, p. 11-15, Apr 2017.

DENNY, J. B. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. **Curr Neuropharmacol**, 4, n. 4, p. 293-304, Oct 2006.

DING, C.; HAMMARLUND, M. Mechanisms of injury-induced axon degeneration. **Curr Opin Neurobiol**, 57, p. 171-178, 08 2019.

DONG, W.; WANG, F.; GUO, W.; ZHENG, X. *et al.* A β 25-35 Suppresses Mitochondrial Biogenesis in Primary Hippocampal Neurons. **Cell Mol Neurobiol**, 36, n. 1, p. 83-91, Jan 2016.

DUAN, W. Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging. **Front Aging Neurosci**, 5, p. 36, 2013.

ELHADY, M. A.; KHALAF, A. A. A.; KAMEL, M. M.; NOSHY, P. A. Carvacrol ameliorates behavioral disturbances and DNA damage in the brain of rats exposed to propiconazole. **Neurotoxicology**, 70, p. 19-25, 01 2019.

ENCIU, A. M.; NICOLESCU, M. I.; MANOLE, C. G.; MUREȘANU, D. F. *et al.* Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. **BMC Neurol**, 11, p. 75, Jun 23 2011.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

FLYNN, K. C. The cytoskeleton and neurite initiation. **Bioarchitecture**, 3, n. 4, p. 86-109, 2013 Jul-Aug 2013.

FU, H.; HARDY, J.; DUFF, K. E. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. **Nat Neurosci**, 21, n. 10, p. 1350-1358, 10 2018.

FUKUYAMA, Y.; KUBO, M.; HARADA, K. The search for, and chemistry and mechanism of, neurotrophic natural products. **J Nat Med**, 74, n. 4, p. 648-671, Sep 2020.

GCWENSA, N. Z.; RUSSELL, D. L.; COWELL, R. M.; VOLPICELLI-DALEY, L. A. Molecular Mechanisms Underlying Synaptic and Axon Degeneration in Parkinson's Disease. **Front Cell Neurosci**, 15, p. 626128, 2021.

GEETHA, T.; REGE, S. D.; MATHEWS, S. E.; MEAKIN, S. O. *et al.* Nerve growth factor receptor TrkA, a new receptor in insulin signaling pathway in PC12 cells. **J Biol Chem**, 288, n. 33, p. 23807-23813, Aug 16 2013.

GODOY, J. A.; RIOS, J. A.; ZOLEZZI, J. M.; BRAIDY, N. *et al.* Signaling pathway cross talk in Alzheimer's disease. **Cell Commun Signal**, 12, p. 23, Mar 28 2014.

GOLLO, A. L.; TANOBE, V. O. A.; DE MELO PEREIRA, G. V.; MARIN, O. *et al.* Phytochemical analysis and biological activities of in vitro cultured *Nidularium procerum*, a bromeliad vulnerable to extinction. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 7008, 04 24 2020.

GOLPICH, M.; AMINI, E.; MOHAMED, Z.; AZMAN ALI, R. *et al.* Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. **CNS Neurosci Ther**, 23, n. 1, p. 5-22, Jan 2017.

GORDON, T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurosurg Focus**, 26, n. 2, p. E3, Feb 2009.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 73, n. 7, p. 2424-2428, Jul 1976.

GREENGARD, P.; VALTORTA, F.; CZERNIK, A. J.; BENFENATI, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science**, 259, n. 5096, p. 780-785, Feb 05 1993.

GUAN, X.; LI, X.; YANG, X.; YAN, J. *et al.* The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation. **Life Sci**, 235, p. 116795, Oct 2019.

GULYAEVA, N. V. Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. **Biochemistry (Mosc)**, 82, n. 3, p. 237-242, Mar 2017.

GUO, W.; QIAN, L.; ZHANG, J.; ZHANG, W. *et al.* Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. **J Neurosci Res**, 89, n. 11, p. 1723-1736, Nov 2011.

GUPTA, V.; SHARMA, B. Role of Phytochemicals in Neurotrophins Mediated Regulation of Alzheimer's Disease. **Int J Complement Alt Med**, 7, n. 4, p. 00231, 2017.

HAMADA, N.; FUJITA, Y.; TANAKA, A.; NAOI, M. *et al.* Metabolites of sesamin, a major lignan in sesame seeds, induce neuronal differentiation in PC12 cells through activation of ERK1/2 signaling pathway. **J Neural Transm (Vienna)**, 116, n. 7, p. 841-852, Jul 2009.

HAMANN, K.; SHI, R. Acrolein scavenging: a potential novel mechanism of attenuating oxidative stress following spinal cord injury. **J Neurochem**, 111, n. 6, p. 1348-1356, Dec 2009.

HAN, X.; TAI, H.; WANG, X.; WANG, Z. *et al.* AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD(+) elevation. **Aging Cell**, 15, n. 3, p. 416-427, 06 2016.

HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 2, p. 121-135, 02 2018.

HO, W. C.; HSU, C. C.; HUANG, H. J.; WANG, H. T. *et al.* Anti-inflammatory Effect of AZD6244 on Acrolein-Induced Neuroinflammation. **Mol Neurobiol**, 57, n. 1, p. 88-95, Jan 2020.

HOLAHAN, M. R. A Shift from a Pivotal to Supporting Role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the Coordination of Axonal Structural and Functional Plasticity. **Front Cell Neurosci**, 11, p. 266, 2017.

HOU, N.; MAI, Y.; QIU, X.; YUAN, W. *et al.* Carvacrol Attenuates Diabetic Cardiomyopathy by Modulating the PI3K/AKT/GLUT4 Pathway in Diabetic Mice. **Front Pharmacol**, 10, p. 998, 2019.

HOU, Y.; DAN, X.; BABBAR, M.; WEI, Y. *et al.* Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 10, p. 565-581, 10 2019.

HOUTKOOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 4, p. 225-238, Mar 07 2012.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, 24, p. 677-736, 2001.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annu Rev Biochem**, 72, p. 609-642, 2003.

HUANG, H. J.; WANG, H. T.; YEH, T. Y.; LIN, B. W. *et al.* Neuroprotective effect of selumetinib on acrolein-induced neurotoxicity. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 12497, Jun 14 2021.

HUANG, W.; HUANG, Y.; HUANG, R. Q.; HUANG, C. G. *et al.* SIRT3 Expression Decreases with Reactive Oxygen Species Generation in Rat Cortical Neurons during Early Brain Injury Induced by Experimental Subarachnoid Hemorrhage. **Biomed Res Int**, 2016, p. 8263926, 2016.

HUANG, Y. J.; JIN, M. H.; PI, R. B.; ZHANG, J. J. *et al.* Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo. **Toxicol Lett**, 217, n. 3, p. 184-191, Mar 13 2013.

IGARASHI, K.; UEMURA, T.; KASHIWAGI, K. Acrolein toxicity at advanced age: present and future. **Amino Acids**, 50, n. 2, p. 217-228, 02 2018.

IGARASHI, K.; UEMURA, T.; KASHIWAGI, K. Assessing acrolein for determination of the severity of brain stroke, dementia, renal failure, and Sjögren's syndrome. **Amino Acids**, 52, n. 2, p. 119-127, Feb 2020.

JACKSON, T. R.; BLADER, I. J.; HAMMONDS-ODIE, L. P.; BURGA, C. R. *et al.* Initiation and maintenance of NGF-stimulated neurite outgrowth requires activation of a phosphoinositide 3-kinase. **J Cell Sci**, 109 (Pt 2), p. 289-300, Feb 1996.

JANKOVIC, J.; TAN, E. K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 91, n. 8, p. 795-808, 08 2020.

JARA, C.; TORRES, A. K.; OLESEN, M. A.; TAPIA-ROJAS, C. Mitochondrial Dysfunction as a Key Event during Aging: From Synaptic Failure to Memory Loss. *In*: BALOYANNIS, S. (Ed.). **Mitochondria and Brain Disorders**, **IntechOpen Book Series**, 2019. cap. 5.

JAVED, H.; MEERAN, M. F. N.; JHA, N. K.; OJHA, S. Carvacrol, a Plant Metabolite Targeting Viral Protease (M. **Front Plant Sci**, 11, p. 601335, 2020.

JEON, C. Y.; JIN, J. K.; KOH, Y. H.; CHUN, W. *et al.* Neurites from PC12 cells are connected to each other by synapse-like structures. **Synapse**, 64, n. 10, p. 765-772, Oct 2010.

JIANG, H.; TIAN, S. L.; ZENG, Y.; LI, L. L. *et al.* TrkA pathway(s) is involved in regulation of TRPM7 expression in hippocampal neurons subjected to ischemic-reperfusion and oxygen-glucose deprivation. **Brain Res Bull**, 76, n. 1-2, p. 124-130, May 15 2008.

JODYNIS-LIEBERT, J.; KUJAWSKA, M. Biphasic Dose-Response Induced by Phytochemicals: Experimental Evidence. **J Clin Med**, 9, n. 3, Mar 06 2020.

JOSEPHY-HERNANDEZ, S.; PIRVULESCU, I.; MAIRA, M.; ABOULKASSIM, T. *et al.* Pharmacological interrogation of TrkA-mediated mechanisms in hippocampal-dependent memory consolidation. **PLoS One**, 14, n. 6, p. e0218036, 2019.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytother Res**, 21, n. 3, p. 259-261, Mar 2007.

JĘŚKO, H.; WENCEL, P.; STROSZNAJDER, R. P.; STROSZNAJDER, J. B. Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. **Neurochem Res**, 42, n. 3, p. 876-890, Mar 2017.

KANO, Y.; HORIE, N.; DOI, S.; ARAMAKI, F. *et al.* Artepillin C derived from propolis induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via ERK and p38 MAPK pathways. **Neurochem Res**, 33, n. 9, p. 1795-1803, Sep 2008.

KAPITEIN, L. C.; HOOGENRAAD, C. C. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. **Neuron**, 87, n. 3, p. 492-506, Aug 05 2015.

KAUFMANN, D.; DOGRA, A. K.; WINK, M. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. **J Pharm Pharmacol**, 63, n. 10, p. 1368-1371, Oct 2011.

KAWASAKI, A.; OKADA, M.; TAMADA, A.; OKUDA, S. *et al.* Growth Cone Phosphoproteomics Reveals that GAP-43 Phosphorylated by JNK Is a Marker of Axon Growth and Regeneration. **iScience**, 4, p. 190-203, Jun 29 2018.

KEMP, S. W.; WEBB, A. A.; DHALIWAL, S.; SYED, S. *et al.* Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat. **Exp Neurol**, 229, n. 2, p. 460-470, Jun 2011.

KESSELS, M. M.; SCHWINTZER, L.; SCHLOBINSKI, D.; QUALMANN, B. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. **Eur J Cell Biol**, 90, n. 11, p. 926-933, Nov 2011.

KHALIL, A.; KOVAC, S.; MORRIS, G.; WALKER, M. C. Carvacrol after status epilepticus (SE) prevents recurrent SE, early seizures, cell death, and cognitive decline. **Epilepsia**, 58, n. 2, p. 263-273, 02 2017.

KHORAMJOUY, M.; NADERI, N.; KOBARFARD, F.; HEIDARLI, E. *et al.* An Intensified Acrolein Exposure Can Affect Memory and Cognition in Rat. **Neurotox Res**, 39, n. 2, p. 277-291, Apr 2021.

KIM, E.; CHOI, Y.; JANG, J.; PARK, T. Carvacrol Protects against Hepatic Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet by Enhancing SIRT1-AMPK Signaling. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2013, p. 290104, 2013.

KOERKER, R. L.; BERLIN, A. J.; SCHNEIDER, F. H. The cytotoxicity of short-chain alcohols and aldehydes in cultured neuroblastoma cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, 37, n. 2, p. 281-288, Aug 1976.

KOVACS, G. G. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. **Handb Clin Neurol**, 145, p. 301-307, 2017.

KRAUSS, R.; BOSANAC, T.; DEVRAJ, R.; ENGBER, T. *et al.* Axons Matter: The Promise of Treating Neurodegenerative Disorders by Targeting SARM1-Mediated Axonal Degeneration. **Trends Pharmacol Sci**, 41, n. 4, p. 281-293, Apr 2020.

L'EPISCOPO, F.; SERAPIDE, M. F.; TIROLO, C.; TESTA, N. *et al.* A Wnt1 regulated Frizzled-1/ β -Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. **Mol Neurodegener**, 6, p. 49, Jul 13 2011.

LAH, J. J.; BURRY, R. W. Neuronotypic differentiation results in reduced levels and altered distribution of synaptophysin in PC12 cells. **J Neurochem**, 60, n. 2, p. 503-512, Feb 1993.

LEE, B.; YEOM, M.; SHIM, I.; LEE, H. *et al.* Inhibitory effect of carvacrol on lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats. **Korean J Physiol Pharmacol**, 24, n. 1, p. 27-37, Jan 2020.

LEE, S.; SHEA, T. B. The high molecular weight neurofilament subunit plays an essential role in axonal outgrowth and stabilization. **Biol Open**, 3, n. 10, p. 974-981, Sep 26 2014.

LEUNER, B.; SABIHI, S. The birth of new neurons in the maternal brain: Hormonal regulation and functional implications. **Front Neuroendocrinol**, 41, p. 99-113, 04 2016.

LEWIS, T. L.; COURCHET, J.; POLLEUX, F. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. **J Cell Biol**, 202, n. 6, p. 837-848, Sep 16 2013.

LINDENBAUM, M. H.; CARBONETTO, S.; GROSVELD, F.; FLAVELL, D. *et al.* Transcriptional and post-transcriptional effects of nerve growth factor on expression of the three neurofilament subunits in PC-12 cells. **J Biol Chem**, 263, n. 12, p. 5662-5667, Apr 25 1988.

LINS, L. C. R. F.; SOUZA, M. F.; BISPO, J. M. M.; GOIS, A. M. *et al.* Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. **Brain Res Bull**, 139, p. 9-15, 05 2018.

LIU, X.; WANG, X.; LU, J. Tenuifoliside A promotes neurite outgrowth in PC12 cells via the PI3K/AKT and MEK/ERK/CREB signaling pathways. **Mol Med Rep**, 12, n. 5, p. 7637-7642, Nov 2015.

LIU-SNYDER, P.; MCNALLY, H.; SHI, R.; BORGENS, R. B. Acrolein-mediated mechanisms of neuronal death. **J Neurosci Res**, 84, n. 1, p. 209-218, Jul 2006.

LONGO, F. M.; MASSA, S. M. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. **Nat Rev Drug Discov**, 12, n. 7, p. 507-525, Jul 2013.

LOPACHIN, R. M.; BARBER, D. S.; GAVIN, T. Molecular mechanisms of the conjugated alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives: relevance to neurotoxicity and neurodegenerative diseases. **Toxicol Sci**, 104, n. 2, p. 235-249, Aug 2008.

LOPACHIN, R. M.; BARBER, D. S.; GEOHAGEN, B. C.; GAVIN, T. *et al.* Structure-toxicity analysis of type-2 alkenes: in vitro neurotoxicity. **Toxicol Sci**, 95, n. 1, p. 136-146, Jan 2007.

LOPACHIN, R. M.; GAVIN, T.; BARBER, D. S. Type-2 alkenes mediate synaptotoxicity in neurodegenerative diseases. **Neurotoxicology**, 29, n. 5, p. 871-882, Sep 2008.

LOPACHIN, R. M.; GEOHAGEN, B. C.; NORDSTROEM, L. U. Mechanisms of soft and hard electrophile toxicities. **Toxicology**, 418, p. 62-69, 04 15 2019.

LOVELL, M. A.; XIE, C.; MARKESBERY, W. R. Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease. **Neurology**, 51, n. 6, p. 1562-1566, Dec 1998.

LOVELL, M. A.; XIE, C.; MARKESBERY, W. R. Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. **Free Radic Biol Med**, 29, n. 8, p. 714-720, Oct 15 2000.

LU, Q.; MUNDY, M.; CHAMBERS, E.; LANGE, T. *et al.* Alda-1 Protects Against Acrolein-Induced Acute Lung Injury and Endothelial Barrier Dysfunction. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 57, n. 6, p. 662-673, 12 2017.

LUO, J.; ROBINSON, J. P.; SHI, R. Acrolein-induced cell death in PC12 cells: role of mitochondria-mediated oxidative stress. **Neurochem Int**, 47, n. 7, p. 449-457, Dec 2005.

MADAY, S.; TWELVETREES, A. E.; MOUGHAMIAN, A. J.; HOLZBAUR, E. L. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. **Neuron**, 84, n. 2, p. 292-309, Oct 22 2014.

MAIESE, K. Sirtuins in metabolic disease: innovative therapeutic strategies with SIRT1, AMPK, mTOR, and nicotinamide. *In*: MAIESE, K. (Ed.). **Sirtuin Biology in Cancer and Metabolic Disease**, 2021. cap. 1, p. 3-23.

MAINARDI, M.; FUSCO, S.; GRASSI, C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. **Neural Plast**, 2015, p. 657928, 2015.

MAJDAN, M.; WALSH, G. S.; ALOYZ, R.; MILLER, F. D. TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. **J Cell Biol**, 155, n. 7, p. 1275-1285, Dec 24 2001.

MALIARTCHOUK, S.; FENG, Y.; IVANISEVIC, L.; DEBEIR, T. *et al.* A designed peptidomimetic agonistic ligand of TrkA nerve growth factor receptors. **Mol Pharmacol**, 57, n. 2, p. 385-391, Feb 2000.

MANOUCHEHRABADI, M.; FARHADI, M.; AZIZI, Z.; TORKAMAN-BOUTORABI, A. Carvacrol Protects Against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease. **Neurotox Res**, 37, n. 1, p. 156-170, Jan 2020.

MARKLUND, N.; BAREYRE, F. M.; ROYO, N. C.; THOMPSON, H. J. *et al.* Cognitive outcome following brain injury and treatment with an inhibitor of Nogo-A in association with an attenuated downregulation of hippocampal growth-associated protein-43 expression. **J Neurosurg**, 107, n. 4, p. 844-853, Oct 2007.

MARTORANA, F.; GAGLIO, D.; BIANCO, M. R.; APREA, F. *et al.* Differentiation by nerve growth factor (NGF) involves mechanisms of crosstalk between energy homeostasis and mitochondrial remodeling. **Cell Death Dis**, 9, n. 3, p. 391, 03 09 2018.

MATEOS-APARICIO, P.; RODRÍGUEZ-MORENO, A. The Impact of Studying Brain Plasticity. **Front Cell Neurosci**, 13, p. 66, 2019.

MATSUI, C.; INOUE, E.; KAKITA, A.; ARITA, K. *et al.* Involvement of the γ -secretase-mediated EphA4 signaling pathway in synaptic pathogenesis of Alzheimer's disease. **Brain Pathol**, 22, n. 6, p. 776-787, Nov 2012.

MATVEYCHUK, D.; DURSUN, S. M.; WOOD, P. L.; BAKER, G. B. Reactive Aldehydes and Neurodegenerative Disorders. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology* 21, n. 4, p. 277-288, 2011.

MCFARTHING, K.; BUFF, S.; RAFALOFF, G.; DOMINEY, T. *et al.* Parkinson's Disease Drug Therapies in the Clinical Trial Pipeline: 2020. *J Parkinsons Dis*, 10, n. 3, p. 757-774, 2020.

MELDOLESI, J. Neurite outgrowth: this process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. *Brain Res Rev*, 66, n. 1-2, p. 246-255, Jan 07 2011.

MELO, F. H.; MOURA, B. A.; DE SOUSA, D. P.; DE VASCONCELOS, S. M. *et al.* Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol*, 25, n. 3, p. 362-367, Jun 2011.

MIRZA, F. J.; ZAHID, S. The Role of Synapsins in Neurological Disorders. *Neurosci Bull*, 34, n. 2, p. 349-358, Apr 2018.

MITCHELL, P. J.; HANSON, J. C.; QUETS-NGUYEN, A. T.; BERGERON, M. *et al.* A quantitative method for analysis of in vitro neurite outgrowth. *J Neurosci Methods*, 164, n. 2, p. 350-362, Aug 2007.

MIZOI, M.; YOSHIDA, M.; SAIKI, R.; WARAGAI, M. *et al.* Distinction between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease by CSF amyloid β 40 and β 42, and protein-conjugated acrolein. *Clin Chim Acta*, 430, p. 150-155, Mar 20 2014.

MOGHE, A.; GHARE, S.; LAMOREAU, B.; MOHAMMAD, M. *et al.* Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. *Toxicol Sci*, 143, n. 2, p. 242-255, Feb 2015.

MOHAMMEDI, Z. Carvacrol: An Update of Biological Activities and Mechanism of Action. *Open Access Journal of Chemistry*, 1, n. 1, p. 53-62, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983.

MUDDAPU, V. R.; DHARSHINI, S. A. P.; CHAKRAVARTHY, V. S.; GROMIHA, M. M. Neurodegenerative Diseases - Is Metabolic Deficiency the Root Cause? *Front Neurosci*, 14, p. 213, 2020.

MURPHY, A.; BREEN, K. C.; LONG, A.; FEIGHERY, C. *et al.* Neurofilament expression in human T lymphocytes. *Immunology*, 79, n. 1, p. 167-170, May 1993.

MURUGAIYAH, V.; MATTSON, M. P. Neurohormetic phytochemicals: An evolutionary-bioenergetic perspective. *Neurochem Int*, 89, p. 271-280, Oct 2015.

NAGLE, A. A.; GAN, F. F.; JONES, G.; SO, C. L. *et al.* Induction of tumor cell death through targeting tubulin and evoking dysregulation of cell cycle regulatory proteins by multifunctional cinnamaldehydes. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e50125, 2012.

NAKAGAWA, S.; OKA, D.; JINNO, Y.; TAKEI, Y. *et al.* Topical application of cyclosporine on guinea pig allergic contact dermatitis. **Arch Dermatol**, 124, n. 6, p. 907-910, Jun 1988.

NAKAMURA, M.; TOMITORI, H.; SUZUKI, T.; SAKAMOTO, A. *et al.* Inactivation of GAPDH as one mechanism of acrolein toxicity. **Biochem Biophys Res Commun**, 430, n. 4, p. 1265-1271, Jan 25 2013.

NAOI, M.; INABA-HASEGAWA, K.; SHAMOTO-NAGAI, M.; MARUYAMA, W. Neurotrophic function of phytochemicals for neuroprotection in aging and neurodegenerative disorders: modulation of intracellular signaling and gene expression. **J Neural Transm (Vienna)**, 124, n. 12, p. 1515-1527, 12 2017.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 287, n. 5, p. R1244-1249, Nov 2004.

NEGRE-SALVAYRE, A.; COATRIEUX, C.; INGUENEAU, C.; SALVAYRE, R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **Br J Pharmacol**, 153, n. 1, p. 6-20, Jan 2008.

NOORI, A.; MEZLINI, A. M.; HYMAN, B. T.; SERRANO-POZO, A. *et al.* Systematic review and meta-analysis of human transcriptomics reveals neuroinflammation, deficient energy metabolism, and proteostasis failure across neurodegeneration. **Neurobiol Dis**, 149, p. 105225, 02 2021.

O'BRIEN, P. J.; SIRAKI, A. G.; SHANGARI, N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. **Crit Rev Toxicol**, 35, n. 7, p. 609-662, Aug 2005.

PARNAS, M.; PETERS, M.; DADON, D.; LEV, S. *et al.* Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. **Cell Calcium**, 45, n. 3, p. 300-309, Mar 2009.

PATHAK, D.; BERTHET, A.; NAKAMURA, K. Energy failure: does it contribute to neurodegeneration? **Ann Neurol**, 74, n. 4, p. 506-516, Oct 2013.

PETROVIC, S.; ARSIC, A.; RISTIC-MEDIC, D.; CVETKOVIC, Z. *et al.* Lipid Peroxidation and Antioxidant Supplementation in Neurodegenerative Diseases: A Review of Human Studies. **Antioxidants (Basel)**, 9, n. 11, Nov 13 2020.

PHAN, C. W.; LEE, G. S.; HONG, S. L.; WONG, Y. T. *et al.* *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. cultivated under tropical conditions: isolation of hericenones and demonstration of NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells via MEK/ERK and PI3K-Akt signaling pathways. **Food Funct**, 5, n. 12, p. 3160-3169, Dec 2014.

PICCONI, B.; PICCOLI, G.; CALABRESI, P. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. **Adv Exp Med Biol**, 970, p. 553-572, 2012.

PICKLO, M. J.; MONTINE, T. J. Acrolein inhibits respiration in isolated brain mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, 1535, n. 2, p. 145-152, Feb 14 2001.

POCERNICH, C. B.; CARDIN, A. L.; RACINE, C. L.; LAUDERBACK, C. M. *et al.* Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. **Neurochem Int**, 39, n. 2, p. 141-149, Aug 2001.

QU, J.; WU, Y. X.; ZHANG, T.; QIU, Y. *et al.* Sirt3 confers protection against acrolein-induced oxidative stress in cochlear nucleus neurons. **Neurochem Int**, 114, p. 1-9, 03 2018.

RAEFSKY, S. M.; MATTSON, M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. **Free Radic Biol Med**, 102, p. 203-216, 01 2017.

RANA, P.; FRANCO, E. F.; RAO, Y.; SYED, K. *et al.* Evaluation of the Common Molecular Basis in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Int J Mol Sci**, 20, n. 15, Jul 30 2019.

RASBAND; WS. **ImageJ U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.** 1997-2015.

RASHEDINIA, M.; LARI, P.; ABNOUS, K.; HOSSEINZADEH, H. Protective effect of crocin on acrolein-induced tau phosphorylation in the rat brain. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, 75, n. 2, p. 208-219, 2015.

REHBACH, K.; KESAVAN, J.; HAUSER, S.; RITZENHOFEN, S. *et al.* Multiparametric rapid screening of neuronal process pathology for drug target identification in HSP patient-specific neurons. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 9615, 07 03 2019.

RENAUD, J.; MARTINOLI, M. G. Considerations for the Use of Polyphenols as Therapies in Neurodegenerative Diseases. **Int J Mol Sci**, 20, n. 8, Apr 16 2019.

ROCCO, M. L.; SOLIGO, M.; MANNI, L.; ALOE, L. Nerve Growth Factor: Early Studies and Recent Clinical Trials. **Curr Neuropharmacol**, 16, n. 10, p. 1455-1465, 2018.

ROMANO, C.; NICHOLS, R. A.; GREENGARD, P.; GREENE, L. A. Synapsin I in PC12 cells. I. Characterization of the phosphoprotein and effect of chronic NGF treatment. **J Neurosci**, 7, n. 5, p. 1294-1299, May 1987.

RUDERMAN, N. B.; XU, X. J.; NELSON, L.; CACICEDO, J. M. *et al.* AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 298, n. 4, p. E751-760, Apr 2010.

SAINATH, R.; GALLO, G. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. **Cell Tissue Res**, 359, n. 1, p. 267-278, Jan 2015.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. **Ageing Res Rev**, 11, n. 2, p. 230-241, Apr 2012.

SALVADORES, N.; SANHUEZA, M.; MANQUE, P.; COURT, F. A. Axonal Degeneration during Aging and Its Functional Role in Neurodegenerative Disorders. **Front Neurosci**, 11, p. 451, 2017.

SAXENA, U. Bioenergetics failure in neurodegenerative diseases: back to the future. **Expert Opin Ther Targets**, 16, n. 4, p. 351-354, Apr 2012.

SCHIMMELPFENG, J.; WEIBEZAHN, K. F.; DERTINGER, H. Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. **J Neurosci Methods**, 139, n. 2, p. 299-306, Oct 30 2004.

SEIDLER, N. W.; SQUIRE, T. J. Abeta-polyacrolein aggregates: novel mechanism of plastic formation in senile plaques. **Biochem Biophys Res Commun**, 335, n. 2, p. 501-504, Sep 23 2005.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, 298, n. 5594, p. 789-791, Oct 2002.

SEOW, S. L. S.; HONG, S. L.; LEE, G. S.; MALEK, S. N. A. *et al.* 6-shogaol, a neuroactive compound of ginger (jahe gajah) induced neuritogenic activity via NGF responsive pathways in PC-12 cells. **BMC Complement Altern Med**, 17, n. 1, p. 334, Jun 24 2017.

SFERRA, A.; NICITA, F.; BERTINI, E. Microtubule Dysfunction: A Common Feature of Neurodegenerative Diseases. **Int J Mol Sci**, 21, n. 19, Oct 05 2020.

SHAHROKHI RAEINI, A.; HAFIZIBARJIN, Z.; REZVANI, M. E.; SAFARI, F. *et al.* Carvacrol suppresses learning and memory dysfunction and hippocampal damages caused by chronic cerebral hypoperfusion. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 393, n. 4, p. 581-589, 04 2020.

SHAMOTO-NAGAI, M.; MARUYAMA, W.; HASHIZUME, Y.; YOSHIDA, M. *et al.* In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity. **J Neural Transm (Vienna)**, 114, n. 12, p. 1559-1567, 2007.

SIFFRIN, V.; VOGT, J.; RADBRUCH, H.; NITSCH, R. *et al.* Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. **Trends Neurosci**, 33, n. 4, p. 202-210, Apr 2010.

SILVA, A. R.; GROSSO, C.; DELERUE-MATOS, C.; ROCHA, J. M. Comprehensive review on the interaction between natural compounds and brain receptors: Benefits and toxicity. **Eur J Med Chem**, 174, p. 87-115, Jul 15 2019.

SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, 24, n. 8, Apr 22 2019.

SMITH, R. A.; ORR, D. J.; HAETZMAN, M. L.; MACPHERSON, N. *et al.* The response of primary cultured adult mouse sensory neurons to ethanol, propanol, acetaldehyde and acrolein treatments. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, 58, n. 5, p. 323-330, 1990.

STAMPANONI BASSI, M.; IEZZI, E.; GILIO, L.; CENTONZE, D. *et al.* Synaptic Plasticity Shapes Brain Connectivity: Implications for Network Topology. **Int J Mol Sci**, 20, n. 24, Dec 08 2019.

STEVENS, J. F.; MAIER, C. S. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. **Mol Nutr Food Res**, 52, n. 1, p. 7-25, Jan 2008.

SUCHOWERSKA, A. K.; FATH, T. Cytoskeletal changes in diseases of the nervous system. **Front. Biol.**, 9, n. 1, p. 5-17, 2014.

SUGINO, T.; MARUYAMA, M.; TANNO, M.; KUNO, A. *et al.* Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. **FEBS Lett**, 584, n. 13, p. 2821-2826, Jul 02 2010.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 55, n. 3, p. 304-318, 2015.

TAO-CHENG, J. H.; DOSEMECI, A.; BRESSLER, J. P.; BRIGHTMAN, M. W. *et al.* Characterization of synaptic vesicles and related neuronal features in nerve growth factor and ras oncogene differentiated PC12 cells. **J Neurosci Res**, 42, n. 3, p. 323-334, Oct 15 1995.

TERRY, R. D. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, 59, n. 12, p. 1118-1119, Dec 2000.

TIAN, S. L.; JIANG, H.; ZENG, Y.; LI, L. L. *et al.* NGF-induced reduction of an outward-rectifying TRPM7-like current in rat CA1 hippocampal neurons. **Neurosci Lett**, 419, n. 2, p. 93-98, May 29 2007.

TSCHÄPE, J. A.; HAMMERSCHMIED, C.; MÜHLIG-VERSEN, M.; ATHENSTAEDT, K. *et al.* The neurodegeneration mutant löchrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing. **EMBO J**, 21, n. 23, p. 6367-6376, Dec 2002.

TSOU, H. H.; HSU, W. C.; FUH, J. L.; CHEN, S. P. *et al.* Alterations in Acrolein Metabolism Contribute to Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 61, n. 2, p. 571-580, 2018.

TUCKER, R. P.; TRAN, H.; GONG, Q. Neurogenesis and neurite outgrowth in the spinal cord of chicken embryos and in primary cultures of spinal neurons following knockdown of Class III beta tubulin with antisense morpholinos. **Protoplasma**, 234, n. 1-4, p. 97-101, Dec 2008.

UCHIDA, K.; KANEMATSU, M.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. *et al.* Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. **J Biol Chem**, 273, n. 26, p. 16058-16066, Jun 26 1998.

UDOMRUK, S.; KAEWMOOL, C.; PHITAK, T.; POTHACHAROEN, P. *et al.* Sesamin Promotes Neurite Outgrowth under Insufficient Nerve Growth Factor Condition in PC12 Cells through ERK1/2 Pathway and SIRT1 Modulation. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2020, p. 9145458, 2020.

UEMURA, T.; SUZUKI, T.; KO, K.; NAKAMURA, M. *et al.* Structural change and degradation of cytoskeleton due to the acrolein conjugation with vimentin and actin during brain infarction. **Cytoskeleton (Hoboken)**, 77, n. 10, p. 414-421, 10 2020.

UEMURA, T.; SUZUKI, T.; KO, K.; WATANABE, K. *et al.* Inhibition of dendritic spine extension through acrolein conjugation with α -, β -tubulin proteins. **Int J Biochem Cell Biol**, 113, p. 58-66, 08 2019.

VAUDRY, D.; STORK, P. J.; LAZAROVICI, P.; EIDEN, L. E. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. **Science**, 296, n. 5573, p. 1648-1649, May 31 2002.

VENKATESAN, R.; JI, E.; KIM, S. Y. Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: a comprehensive review. **Biomed Res Int**, 2015, p. 814068, 2015.

VERGARA, R. C.; JARAMILLO-RIVERI, S.; LUARTE, A.; MOËNNE-LOCCOZ, C. *et al.* The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. **Front Comput Neurosci**, 13, p. 49, 2019.

VINGTDEUX, V.; GILIBERTO, L.; ZHAO, H.; CHANDAKKAR, P. *et al.* AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. **J Biol Chem**, 285, n. 12, p. 9100-9113, Mar 19 2010.

WANG, B.; HUANG, M.; SHANG, D.; YAN, X. *et al.* Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. **Front Aging Neurosci**, 13, p. 650038, 2021.

WANG, P.; LUO, Q.; QIAO, H.; DING, H. *et al.* The Neuroprotective Effects of Carvacrol on Ethanol-Induced Hippocampal Neurons Impairment via the Antioxidative and Antiapoptotic Pathways. **Oxid Med Cell Longev**, 2017, p. 4079425, 2017.

WANG, X.; MENG, D.; CHANG, Q.; PAN, J. *et al.* Arsenic inhibits neurite outgrowth by inhibiting the LKB1-AMPK signaling pathway. **Environ Health Perspect**, 118, n. 5, p. 627-634, May 2010.

WATSON, S. N.; RISLING, T. E.; HERMANN, P. M.; WILDERING, W. C. Failure of delayed nonsynaptic neuronal plasticity underlies age-associated long-term associative memory impairment. **BMC Neurosci**, 13, p. 103, Aug 2012.

WEINHOLD, B. Acrolein and neuro disorders. **Environ Health Perspect**, 119, n. 2, p. A68, Feb 2011.

WESTERINK, R. H.; EWING, A. G. The PC12 cell as model for neurosecretion. **Acta Physiol (Oxf)**, 192, n. 2, p. 273-285, Feb 2008.

WIATRAK, B.; KUBIS-KUBIAK, A.; PIWOWAR, A.; BARG, E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, 9, n. 4, 04 14 2020.

WILLIAMS, T. I.; LYNN, B. C.; MARKESBERY, W. R.; LOVELL, M. A. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 27, n. 8, p. 1094-1099, Aug 2006.

WON, J. S.; IM, Y. B.; KIM, J.; SINGH, A. K. *et al.* Involvement of AMP-activated-protein-kinase (AMPK) in neuronal amyloidogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 399, n. 4, p. 487-491, Sep 03 2010.

WU, Y.; LI, X.; ZHU, J. X.; XIE, W. *et al.* Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. **Neurosignals**, 19, n. 3, p. 163-174, 2011.

XU, J.; LACOSKE, M. H.; THEODORAKIS, E. A. Neurotrophic natural products: chemistry and biology. **Angew Chem Int Ed Engl**, 53, n. 4, p. 956-987, Jan 2014.

YAMANAKA, Y.; YOSHIDA, S.; DOI, H. NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells in the presence of phosphatidylcholine hydroperoxides: Implication for ageing. **Mech Ageing Dev**, 129, n. 4, p. 215-222, Apr 2008.

YU, H.; ZHANG, Z. L.; CHEN, J.; PEI, A. *et al.* Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **PLoS One**, 7, n. 3, p. e33584, 2012.

YUAN, A.; RAO, M. V.; VEERANNA; NIXON, R. A. Neurofilaments at a glance. **J Cell Sci**, 125, n. Pt 14, p. 3257-3263, Jul 2012.

YUAN, T. F.; LI, W. G.; ZHANG, C.; WEI, H. *et al.* Targeting neuroplasticity in patients with neurodegenerative diseases using brain stimulation techniques. **Transl Neurodegener**, 9, n. 1, p. 44, 12 07 2020.

ZHANG, J.; STURLA, S.; LACROIX, C.; SCHWAB, C. Gut Microbial Glycerol Metabolism as an Endogenous Acrolein Source. **mBio**, 9, n. 1, 01 16 2018.

ZHANG, Q.; ZHANG, Z. J.; WANG, X. H.; MA, J. *et al.* The prescriptions from Shenghui soup enhanced neurite growth and GAP-43 expression level in PC12 cells. **BMC Complement Altern Med**, 16, p. 369, Sep 20 2016.

ZHOU, Z.; AUSTIN, G. L.; YOUNG, L. E. A.; JOHNSON, L. A. *et al.* Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases. **Cells**, 7, n. 12, Nov 23 2018.

ZHU, Q.; SUN, Z.; JIANG, Y.; CHEN, F. *et al.* Acrolein scavengers: reactivity, mechanism and impact on health. **Mol Nutr Food Res**, 55, n. 9, p. 1375-1390, Sep 2011.

ZHU, Y.; XU, J.; HEINEMANN, S. F. Synaptic vesicle exocytosis-endocytosis at central synapses: Fine-tuning at differential patterns of neuronal activity. **Commun Integr Biol**, 2, n. 5, p. 418-419, Sep 2009.

ZILBERTER, Y.; ZILBERTER, M. The vicious circle of hypometabolism in neurodegenerative diseases: Ways and mechanisms of metabolic correction. **J Neurosci Res**, 95, n. 11, p. 2217-2235, 11 2017.

ZOTTI, M.; COLAIANNA, M.; MORGESE, M. G.; TUCCI, P. *et al.* Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. **Molecules**, 18, n. 6, p. 6161-6172, May 2013.

