

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

Fernanda dos Santos Petry

**TOXICIDADE DO PEPTÍDEO A $\beta$ <sub>25-35</sub> EM LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA  
HUMANO (SH-SY5Y): PADRONIZAÇÃO DO MODELO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE NEUROPROTETORA DE ISOFLAVONAS DA SOJA**

Porto Alegre

2012

Fernanda dos Santos Petry

**TOXICIDADE DO PEPTÍDEO A $\beta$ <sub>25-35</sub> EM LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y): PADRONIZAÇÃO DO MODELO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DE ISOFLAVONAS DA SOJA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

Co-orientador: MSc. Fernando Kreutz

Porto Alegre

2012

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo amor, apoio, dedicação, confiança e incentivo permanentes e incondicionais.

Aos professores da UFRGS por todo o conhecimento transmitido.

Aos colegas de graduação pela parceria, troca de ideias e amizade.

À professora Vera Treis Trindade pela orientação, entusiasmo e conhecimentos tão bem transmitidos.

Ao Fernando por todos os ensinamentos.

Aos demais colegas do laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Lipídios que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

Ao professor Fábio Klamt por disponibilizar as células utilizadas neste trabalho.

À Babi pela disponibilidade e grande ajuda na etapa de contagem de células.

Ao Departamento de Bioquímica pela infraestrutura oferecida.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
1.1. Doença de Alzheimer .....	7
1.1.1. Hipótese da cascata amilóide .....	8
1.1.2. Hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal.....	11
1.1.3. Cascata amilóide no desenvolvimento de modelos para DA.....	12
1.2. Isoflavonas da soja .....	13
1.3. Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y como modelo <i>in vitro</i> para estudo da Doença de Alzheimer.....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivos gerais.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. Comentário inicial.....	20
3.2. Artigo científico Toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> e atividade neuroprotetora de isoflavonas da soja na linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).....	21
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>5. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS AO ARTIGO .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abraz: Associação Brasileira de Alzheimer

A $\beta$ :  $\beta$ -amilóide

APP: Proteína precursora amilóide

apoE: Apoproteína E

AR: Ácido retinóico

DA: Doença de Alzheimer

GSK3 $\beta$ : Glicogênio sintase kinase 3 $\beta$

HO: Hoechst

NSE: Enolase específica de neurônio

NeuN: Proteína nuclear de neurônio

PI: Iodeto de propídeo

sAPP $\alpha$ : Fragmento solúvel após hidrólise da APP pela  $\alpha$ -secretase

sAPP $\beta$ : Fragmento solúvel após hidrólise da APP pela  $\beta$ -secretase

SFB: Soro fetal bovino

SH-SY5Y: Linhagem celular de neuroblastoma humano

RE: Receptor estrogênico

TH: Tirosina hidroxilase

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva e irreversível das funções cognitivas. Acredita-se que seu principal mecanismo patogênico seja a produção e o acúmulo cerebral do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), responsável pelo desencadeamento de processo inflamatório, dano oxidativo e morte neuronal. Células SH-SY5Y tem sido bastante utilizadas como modelo para estudos de neurodegeneração e de neuroproteção, entretanto, não há na literatura, adequada padronização deste modelo para a avaliação da toxicidade do peptídeo  $A\beta_{25-35}$ . Por este motivo, este trabalho teve como primeiro objetivo a padronização deste modelo de estudo. Foram comparados diferentes parâmetros para o estabelecimento das condições ideais para reprodução da toxicidade do  $A\beta$ : fenótipo celular (células proliferativas ou diferenciadas com ácido retinóico); tempo de exposição ao peptídeo, bem como sua concentração e estado de agregação (fibrilado ou não fibrilado). Observou-se que células diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico tornam-se mais sensíveis aos efeitos tóxicos do peptídeo, especificamente em sua forma fibrilada, sendo a morte celular, nestas condições, concentração dependente. Nossos resultados permitiram estabelecer a concentração de 25  $\mu$ M do  $A\beta_{25-35}$  fibrilado, com 72 horas de exposição a células diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico, como a condição ideal para reprodução do modelo de toxicidade do peptídeo. Uma vez estabelecido o modelo, o segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a ação neuroprotetora das isoflavonas da soja, genisteína e daizeína, tendo em vista que trabalhos sugerem um aumento no risco de desenvolvimento da DA entre mulheres pós-menopáusicas, bem como uma redução deste risco com o tratamento de reposição hormonal. Os fitoestrógenos, além de compartilharem alguns mecanismos neuroprotetores atribuídos aos estrógenos endógenos, apresentariam a vantagem de serem mais seguros, por não estarem relacionados a aumento no risco carcinogênico. Os resultados obtidos em nosso trabalho apontam uma importante ação neuroprotetora das isoflavonas, isoladas ou associadas, uma vez que foram capazes de reduzir a apoptose e prevenir a necrose desencadeada pelo

peptídeo  $\beta$ -amilóide. Em conjunto, nossos dados estabelecem as condições ideais para reprodução de um modelo *in vitro* para o estudo da toxicidade do peptídeo  $A\beta_{25-35}$  como modelo de DA, e apontam uma importante atividade neuroprotetora dos fitoestrógenos da soja, por mecanismos ainda a serem elucidados.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA), descrita em 1906 pelo médico Alois Alzheimer, é uma desordem neurodegenerativa clinicamente caracterizada por perda progressiva e irreversível da memória e por prejuízo das demais funções cognitivas como aprendizado, raciocínio, capacidade de comunicação e desempenho de atividades cotidianas (Suh and Checler, 2002; Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012).

O diagnóstico da DA é basicamente clínico por exclusão. Uma vez diagnosticado, o paciente já se encontra com capacidade cognitiva significativamente afetada, levando em média de 5 a 10 anos para evoluir a um estágio terminal, em que se torna profundamente incapacitado, mudo e imóvel (Cotran et al., 1994).

Duas formas foram descritas para esta patologia: a forma familiar e a esporádica. A DA familiar é caracterizada por mutações nos genes que codificam as proteínas envolvidas na cascata amilóide (genes da proteína precursora amilóide – APP – e das presenilinas) e, embora represente menos de 5% dos casos, destaca-se por apresentar quadros de evolução mais precoce. Já o tipo esporádico da DA, o mais prevalente na população, apresenta uma evolução mais insidiosa, sendo que os sintomas raramente surgem antes de o paciente atingir a idade de 50 anos (Cotran et al., 1994; Suh and Checler, 2002).

Dentre os principais fatores de risco associados à DA, citam-se a idade, sexo feminino, expressão do alelo E4 do gene da apoE, dano cerebral prévio e doenças cardiovasculares (Suh and Checler, 2002).

Atualmente, a DA é considerada a principal forma de demência entre idosos, correspondendo entre 50 a 70% dos casos diagnosticados. Estima-se que em todo o mundo, mais de 35,6 milhões de pessoas sejam afetadas (WHO, 2012). No Brasil, esta estimativa é de mais de um milhão de pessoas (site da Associação Brasileira de Alzheimer – Abraz, acessado em 15/11/2012). Em relação ao Rio Grande do Sul, são raros os estudos



epidemiológicos, não se dispõem de dados precisos (Chaves et al., 2009). Estatísticas indicam que a doença atingiria 1% da população na faixa etária de 60-64 anos e mais de 40% da população com idade acima de 85 anos (Zinser et al., 2007). Com o aumento da expectativa de vida da população, o número de indivíduos afetados deverá triplicar até 2050 (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012). Considerando que os pacientes com DA requerem cuidados constantes, representando grande gasto ao sistema de saúde, e que até o momento não se dispõe de farmacoterapia eficaz em promover a cura ou retardar a evolução da patologia, torna-se imprescindível aumentar o conhecimento que se tem a respeito de sua patogênese, bem como intensificar os estudos que permitam identificar possíveis drogas neuroprotetoras.

A DA é considerada uma doença multifatorial, cujos mecanismos patogênicos ainda não foram completamente elucidados. As duas principais hipóteses que tentam explicar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da doença são a hipótese da cascata amilóide e a hipótese da degeneração do citoesqueleto neural (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).

#### 1.1.1. A hipótese da cascata amilóide

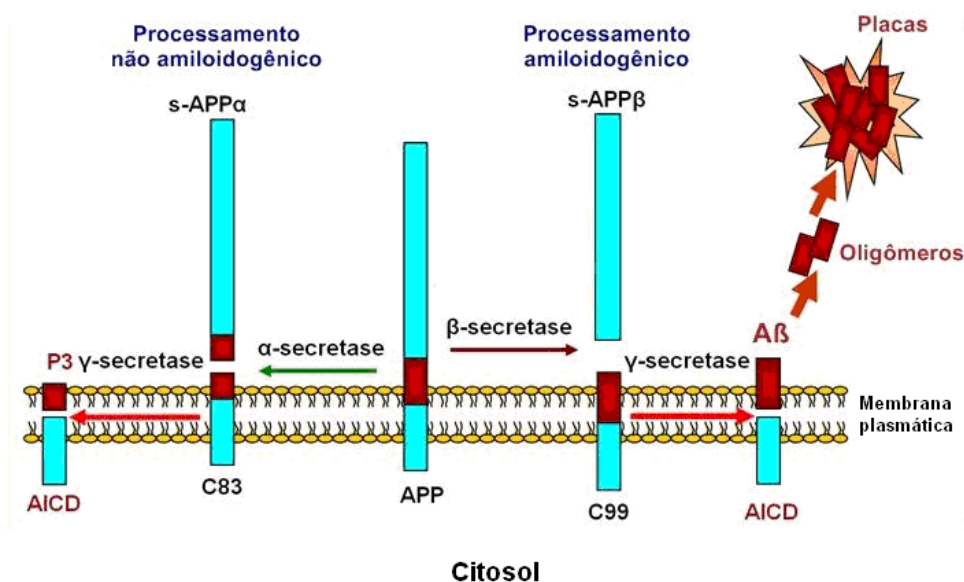
O primeiro achado histopatológico associado ao diagnóstico da DA, foi a observação *post mortem* de placas senis, ou agregados peptídicos extracelulares, em cérebro de paciente afetado com este tipo de demência. A identificação do peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) como principal componente das placas senis, suscitou a hipótese de que um processamento inadequado deste peptídeo estaria envolvido no desenvolvimento da patologia (Graeber et al. 1998; Suh and Checler, 2002; Golde, 2006).

O peptídeo A $\beta$  é produzido pela clivagem de uma proteína chamada proteína precursora amilóide (APP). A APP, expressa de forma constitutiva nas membranas neuronais, pode ser alvo de dois tipos distintos de

processamento: o processamento amiloidogênico e o não-amiloidogênico (Suh and Checler, 2002).

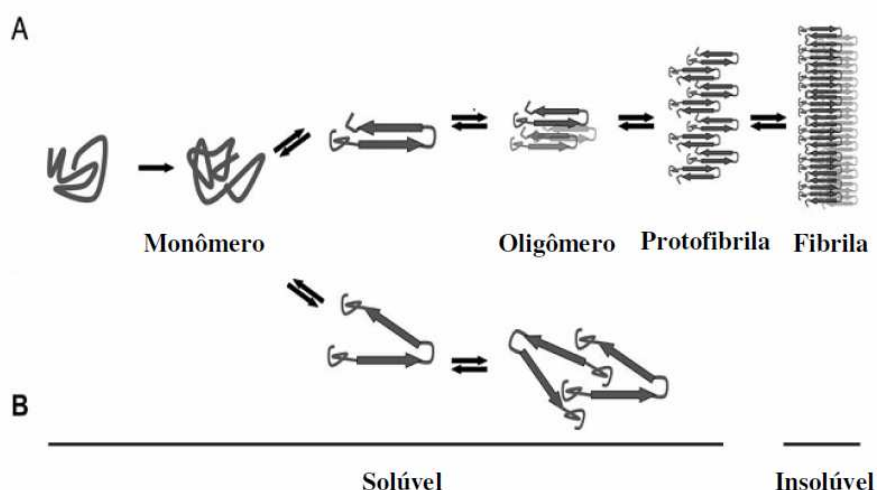
O processamento amiloidogênico da APP, que culminará na produção de um peptídeo A $\beta$ , inicia-se pela ação de uma enzima com atividade beta-secretásica (BACE1), que cliva a proteína precursora na região N-terminal do domínio amilóide, e é seguida pela ação de um complexo enzimático com atividade gama-secretásica, que cliva a APP na região C-terminal do mesmo domínio (Fig. 1) (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).

A via não-amiloidogênica, como o termo indica, representa o processamento da APP que não resulta em produção do peptídeo A $\beta$  e, ao contrário da via amiloidogênica, tem seu processamento iniciado não por beta-secretases, mas sim por enzimas com atividade alfa-secretásica, capazes de clivar a APP no interior do domínio amilóide, impedindo, desta forma, a formação do peptídeo A $\beta$  (Fig. 1) (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).



**Figura 1: Processamento amiloidogênico e não-amiloidogênico da proteína APP por  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases.** Representação esquemática da APP e de seus fragmentos proteolíticos sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  e A $\beta$ . AICD = Domínio intracelular da APP; C83 e C99 = fragmento C-terminal associado à membrana contendo 83 e 99 aminoácidos, respectivamente. (Adaptado de Zhang, 2012)

Uma vez formado e liberado ao meio extracelular, o A $\beta$  pode ter dois destinos: permanecer em sua forma monomérica, ou iniciar um processo de polimerização que culminará na formação de oligômeros e/ou fibrilas (Fig. 2). Embora um crescente número de trabalhos tenha sugerido uma importante participação das ditas formas não fibriladas (principalmente oligômeros) no desencadeamento de neurotoxicidade, o peptídeo fibrilado, por ser insolúvel e de difícil acesso a peptidases, representa a forma de depósito do A $\beta$  no parênquima cerebral, e tem um papel chave na formação das placas senis. Além disso, trabalhos tem sugerido que a forma fibrilada do peptídeo A $\beta$  agiria como reservatório de oligômeros, liberando-os de forma sustentada (Suh and Checler, 2002; Haass and Selkoe, 2007; Pimplikar, 2009).



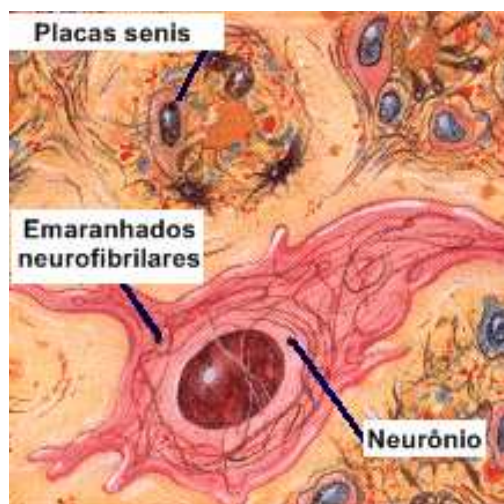
**Figura 2: Processo de oligomerização e fibrilação do peptídeo  $\beta$ -amilóide.** (A) O peptídeo A $\beta$  pode sofrer um processo sequencial de agregação, formando oligômeros, protofibrilas e fibrilas insolúveis. (B) Alternativamente, o A $\beta$  pode sofrer um processo de oligomerização independente, formando oligômeros que, embora não evoluam para a formação de fibrilas, apresentariam considerável efeito neurotóxico. (Adaptado de Da Silva et al., 2009)

Qualquer que seja a forma de maior toxicidade do A $\beta$ , fibrilada ou não fibrilada, o certo é que a cascata amilóide parece desempenhar um

papel chave no desenvolvimento e na progressão da DA (Suh and Checler, 2002; Haass and Selkoe, 2007; Pimplikar, 2009).

### 1.1.2. A hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal

A segunda observação histopatológica em cérebro de pacientes com DA é a formação dos emaranhados neurofibrilares intracelulares, que levam o neurônio a assumir uma morfologia anormal (Fig. 3). Estes emaranhados são formados por agregados de proteína Tau hiperfosforilada.



**Figura 3: Representação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares associados à DA.** (Adaptado do [www.google.com.br](http://www.google.com.br) – acessado em 15/11/2012)

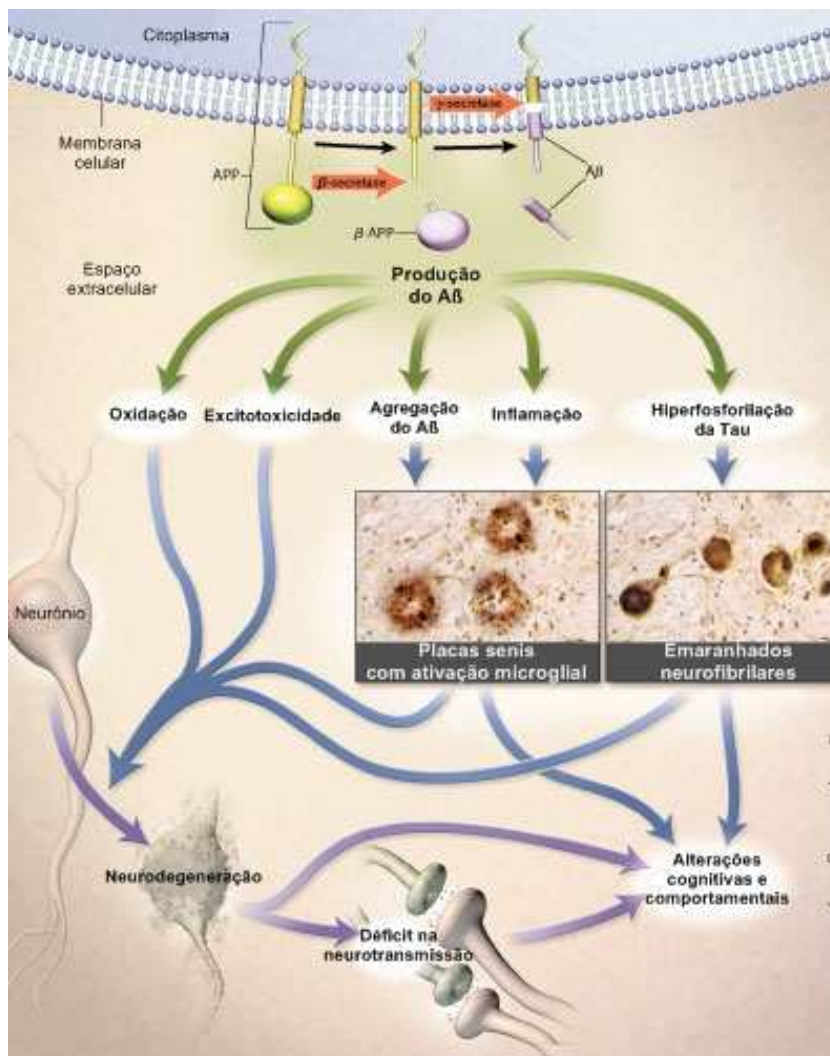
A Tau é uma proteína da família das MAP's (*microtubule associated proteins*), e que tem como principal função promover a estabilização dos microtúbulos (Drechsel et al., 1992). Quando sob ação de enzimas cinases diversas, tais como a GSK3 $\beta$ , a proteína Tau pode ser hiperfosforilada, processo que compromete a ligação desta proteína aos resíduos de tubulina, levando, conseqüentemente, à desestabilização/desestruturação dos microtúbulos, bem como à fibrilação e à deposição intracelular da proteína

Tau na forma de emaranhados neurofibrilares (Suh and Checler, 2002; Iqbal et al., 2005; Hernandez and Avila, 2007).

O desmonte dos microtúbulos, com a consequente desorganização do transporte axonal, aliado à deposição intracelular da proteína Tau hiperfosforilada, levam a alterações bioquímicas e morfológicas dos neurônios, culminando, em última análise, em processo de perda de função e morte neuronal (Suh and Checler, 2002; Iqbal et al., 2005; Hernandez and Avila, 2007).

### *1.1.3. Cascata amilóide no desenvolvimento de modelos para DA*

Embora as alterações celulares desencadeadas pela hiperfosforilação da Tau exerçam um papel importante no desenvolvimento da DA, a maioria dos modelos experimentais que tentam reproduzir a patologia exploram a cascata amilóide, quer seja modulando a produção endógena do peptídeo (modelos transgênicos), quer seja através da administração exógena do peptídeo A $\beta$ . A posição central que a cascata amilóide tem assumido nos modelos de DA em parte é justificável pelas observações de que o peptídeo A $\beta$ , em sua forma fibrilada ou oligomérica, é capaz de desencadear as principais alterações neuroquímicas e celulares que caracterizam a DA: neuroinflamação, excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e formação dos próprios emaranhados neurofibrilares (Suh and Checler, 2002; Rapoport and Ferreira, 2000; Blurton-Jones and Laferla, 2006; Montagut et al., 2006) (Fig. 4).

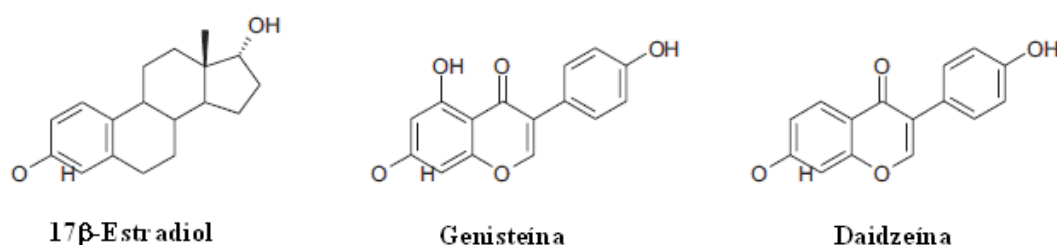


**Figura 4: Papel central da cascata amilóide nas alterações neuroquímicas e celulares que acompanham a DA. (Adaptado de Cummings, 2004)**

## 1.2. ISOFLAVONAS DA SOJA

A soja tem sido utilizada há muito tempo como alimento devido ao seu elevado teor proteico. Entretanto, sua composição química apresenta também compostos polifenólicos, as isoflavonas, responsáveis por importantes propriedades, tais como: atividade antioxidante, estrogênica, anti-cancerígena e efeito neuroprotetor e neurotrófico (Barnes et al., 1996; Denis et al., 1999; Belcher and Zsarnovszky, 2001; Zhao et al., 2002; Yousef et al., 2004; Liang et al., 2008).

As isoflavonas são consideradas fitoestrógenos naturais, encontrados, como já mencionado, na soja (grãos e nos seus derivados). Fitoestrógenos são moléculas derivadas de plantas, estruturalmente semelhantes a estrógenos endógenos e que apresentam estrutura química difenólica que pode se ligar diretamente a receptores estrogênicos (RE,  $\alpha$  e  $\beta$ ). Genisteína, daidzeína e gliciteína são as isoflavonas presentes em maior proporção na soja (Fig. 5), ocorrendo também na forma de glicosídeos, denominados genistina, daidzina e glicitina, respectivamente. Entretanto, estas glicosil isoflavonas apresentam menor atividade biológica (Park et al., 2001).



**Figura 5: Estrutura química das principais isoflavonas da soja ressaltando suas similaridades estruturais com o 17 $\beta$ -estradiol.** (Adaptado de Park et al., 2001)

Embora estas moléculas pareçam exibir propriedades semelhantes às de agonistas de estrógenos, elas também podem atuar como antagonistas parciais destes receptores (RE). Um mecanismo proposto para esta ação seria a inibição competitiva com estrógenos endógenos através da ligação a REs. Trabalhos recentes indicam que os fitoestrógenos exibem uma maior afinidade por RE $\beta$  do que por RE $\alpha$ . Este dado é interessante, já que os RE $\beta$  são mais expressos em regiões cerebrais importantes para a memória e vulneráveis à DA, como o prosencéfalo basal, hipocampo e córtex cerebral. Outros mecanismos de ação sugeridos para os fitoestrógenos são a inibição da tirosina cinase, da topoisomerase de DNA e da aromatase (Zhao et al., 2002).

Baixos níveis de estrógenos em mulheres em período pós-menopausa tem sido relacionados ao maior risco de desenvolvimento da

DA, de osteoporose e de doenças cardiovasculares (Craig and Murphy, 2009). Sabe-se que os estrógenos apresentam atividade antioxidante - prevenindo o dano peroxidativo a lipídios, proteínas e/ou DNA - fato que tem estimulado a utilização da terapia de reposição de estrógenos como medida de prevenção aos danos degenerativos associados à idade. Estudos sugerem que mulheres em pós-menopausa sob terapia de reposição estrogênica apresentariam menor risco de desenvolvimento da DA, embora a utilização a longo prazo desta terapia esteja associada ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama (Tang et al., 1996; Craig and Murphy, 2010; Janicki et al., 2010). Considerando que os fitoestrógenos compartilham atividades antioxidantes e neuroprotetoras semelhantes às dos estrógenos sintéticos, sem, contudo, estarem associados ao risco carcinogênico, alimentos e/ou suplementos a base de soja ou de seus fitoestrógenos tem sido propostos como uma possível alternativa terapêutica na prevenção ou no retardo do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DA (Jin et al., 2007; Pike et al., 2009).

### **1.3. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y COMO MODELO *in vitro* PARA ESTUDO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

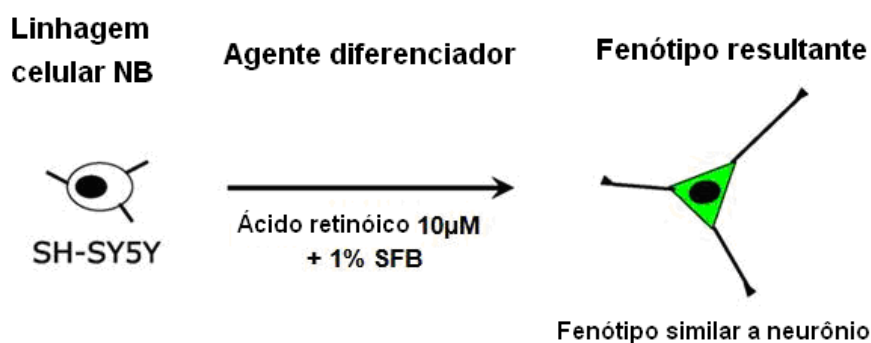
Os neuroblastomas são tumores malignos neuroendócrinos, mais frequentes durante a infância, e que tem como sítio primário principal as glândulas adrenais.

Células SH-SY5Y correspondem a uma linhagem celular, ou seja, células imortalizadas que podem ser mantidas em cultura por um grande período de tempo devido a sua grande capacidade de proliferação (Schüle et al., 2009). Estas células são subclones derivados do neuroblastoma SK-N-SH, isoladas de sítio metastático de medula óssea em 1970. Quando em cultura, estas células se assemelham a neuroblastos do sistema simpático, apresentando morfologia epitelial com citoplasma escasso (Biedler et al., 1978). As células desta linhagem se mantem em estágios iniciais da diferenciação neuronal, sendo caracterizadas bioquimicamente pela



escassez de marcadores neuronais (Biedler et al., 1978; Gilany et al., 2008). Além disso, sendo neuroblastos imaturos, estas células proliferam durante um grande período de tempo, sendo esta uma grande desvantagem do modelo, já que neurônios apresentam baixas taxas de proliferação (Luchtman and Song, 2010). Por este motivo, as células SH-SY5Y proliferativas parecem não representar um modelo experimental adequado para o estudo de mecanismos celulares e moleculares relacionados à patogênese da DA. Com o intuito de contornar estas desvantagens, diversos trabalhos demonstraram que células SH-SY5Y podem ser diferenciadas morfológica e bioquimicamente, adquirindo fenótipo semelhante ao de um neurônio, em resposta a agentes específicos como, por exemplo, o ácido retinóico (AR) (Pahlman et al., 1984; Miloso et al., 2004).

O AR é a forma biologicamente ativa da vitamina A, necessária para o desenvolvimento normal, envolvida em processos de diferenciação, proliferação celular e morfogênese de diversos órgãos e sistemas, como o sistema nervoso (Bain et al., 1995; Mark et al., 2006). Os efeitos desta neurotrofina são mediados pela modulação da expressão de genes por meio da ativação de duas classes de receptores nucleares: os receptores de AR (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e os receptores retinóides X (RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (Mark, 2006; Edsjö et al., 2007). Além de promover a diferenciação, o AR *in vitro* inibe a divisão celular, bloqueando a fase G1/S do ciclo celular (Malik et al., 2000). Desta maneira, o AR exerce papel importante na regulação da transição da célula precursora proliferativa para a célula diferenciada pós-mitótica (Ross et al., 2000), como mostra a figura 6.



**Figura 6: Diferenciação *in vitro* das células SH-SY5Y induzida pelo ácido retinóico (AR).** (Adaptado de Edsjö et al., 2007)

Como marcadores neuronais para avaliação bioquímica do processo de diferenciação das células SH-SY5Y, tem-se a enzima tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante na síntese de catecolaminas e clássico marcador de células dopaminérgicas; a enolase neurônio específica (NSE); e a proteína nuclear de neurônio (NeuN), expressa somente em neurônios em amadurecimento. Por outro lado, há também marcadores de células não diferenciadas como, por exemplo, a nestina, proteína pertencente à família de filamentos intermediários, expressa de maneira dependente do ciclo celular e cuja diminuição da expressão é associada ao término da diferenciação neuronal (Constantinescu et al., 2007; Lopes et al., 2010).

A partir da combinação entre a redução do soro fetal bovino (SFB) para 1% e o tratamento com 10  $\mu$ M de AR, é possível observar a alteração de características morfológicas e bioquímicas das células SH-SY5Y, além da completa redução da taxa de proliferação celular. A morfologia epitelial das células é modificada para a estrelada, com o crescimento de projeções citoplasmáticas (neuritos), já a partir de 24h de tratamento. Em termos de alterações bioquímicas, a partir do 4º dia de tratamento é possível observar um aumento nos marcadores neuronais TH, NSE e NeuN, embora a expressão de nestina não seja alterada neste período. A expressão desta proteína diminui significativamente somente a partir do 7º dia de diferenciação. Além disso, com este mesmo tempo de diferenciação, as

células passam a exibir excitabilidade madura, propagação do potencial de ação e formação de vesículas sinápticas (Sarkanen et al., 2007; Cheung et al., 2009; Lopes et al., 2010). Estes dados em conjunto sugerem, então, que células SH-SY5Y diferenciadas por 7 dias com AR representem um modelo experimental adequado para o estudo sobre mecanismos de neurodegeneração e/ou neuroproteção.

A diferenciação de células SH-SY5Y com AR, no entanto, é considerada um modelo para estudo de neurônios dopaminérgicos, visto que este tratamento leva a um aumento na expressão de TH. Considerando que na DA ocorre um maior comprometimento de neurônios colinérgicos, este fato pode representar uma desvantagem para o desenvolvimento de modelos para estudo da toxicidade do peptídeo A $\beta$ . Em contrapartida, há trabalhos indicando que este mesmo processo de diferenciação leva a um aumento de proteínas da via colinérgica, como a acetilcolinesterase (Zimmermann et al., 2004; Li et al., 2010).

Até o momento, não há na literatura, trabalho comparando a vulnerabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas ou proliferativas, frente à toxicidade do peptídeo A $\beta$  (forma fibrilada ou não fibrilada), de maneira a avaliar a adequabilidade deste modelo para o estudo da DA.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Estabelecer e padronizar um modelo *in vitro* para o estudo da toxicidade do peptídeo  $A\beta_{25-35}$ , utilizando a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y em sua forma proliferativa ou diferenciada por ácido retinóico;
- Avaliar o efeito neuroprotetor das isoflavonas da soja, genisteína e daidzeína, isoladas ou em associação, em diferentes concentrações sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo  $A\beta_{25-35}$ .

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a concentração experimental ideal de  $A\beta_{25-35}$ , bem como seu estado de agregação (fibrilado ou não fibrilado) e tempo de exposição, a fim de reproduzir modelo de toxicidade do peptídeo em células SH-SY5Y;
- Avaliar a possível diferença de vulnerabilidade de células SH-SY5Y proliferativas ou diferenciadas com ácido retinóico por 4 ou 7 dias quanto à toxicidade do  $A\beta_{25-35}$ ;
- Caracterizar o tipo de morte (apoptose inicial, apoptose tardia e/ou necrose) desencadeada pelo  $A\beta$ ;
- Avaliar a ação neuroprotetora das isoflavonas genisteína e daidzeína, utilizadas isoladas ou em associação, em diferentes concentrações.

### 3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho de conclusão de curso correspondem aos dados obtidos experimentalmente, os quais estão organizados na forma de um artigo científico, para posterior submissão à revista *Journal of Biomedical Science*.

**TOXICIDADE DO PEPTÍDEO A $\beta$ <sub>25-35</sub> E ATIVIDADE NEUROPROTETORA  
DE ISOFLAVONAS DA SOJA NA LINHAGEM DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y)**

Fernanda dos Santos Petry<sup>a</sup>, Fernando Kreutz<sup>a,b</sup>, Letícia Ferreira Pettenuzzo<sup>a,b</sup>,  
Vera Maria Treis Trindade<sup>a,b</sup>,

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica – Instituto de  
Ciências Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande Sul.

**\*Autor correspondente:**

Fernanda dos Santos Petry

Dep. de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo – CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: +55 51 3308 5550 Fax: +55 51 3308 5535

E-mail: [fernanda.petry@ufrgs.br](mailto:fernanda.petry@ufrgs.br)

## Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva e irreversível das funções cognitivas. Acredita-se que seu principal mecanismo patogênico seja a produção e o acúmulo cerebral do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), responsável pelo desencadeamento de processo inflamatório, dano oxidativo e morte neuronal. Células SH-SY5Y tem sido bastante utilizadas como modelo para estudos de neurodegeneração e neuroproteção, entretanto, não há na literatura, adequada padronização deste modelo para a avaliação da toxicidade do peptídeo  $A\beta_{25-35}$ . Por este motivo, este trabalho teve como primeiro objetivo a padronização deste modelo de estudo. Foram comparados diferentes parâmetros para o estabelecimento das condições ideais para reprodução da toxicidade do  $A\beta$ : fenótipo celular (células proliferativas ou diferenciadas com ácido retinóico); tempo de exposição ao peptídeo, bem como sua concentração e estado de agregação (fibrilado ou não fibrilado). Observou-se que células diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico tornam-se mais sensíveis aos efeitos tóxicos do peptídeo, especificamente em sua forma fibrilada, sendo a morte celular, nestas condições, concentração dependente. Nossos resultados permitiram estabelecer a concentração de  $25\mu\text{M}$  do  $A\beta_{25-35}$  fibrilado, com 72 horas de exposição a células diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico, como a condição ideal para reprodução do modelo de toxicidade do peptídeo. Uma vez estabelecido o modelo, o segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a ação neuroprotetora das isoflavonas da soja, genisteína e daizeína, tendo em vista que trabalhos sugerem um aumento no risco de desenvolvimento de DA entre mulheres pós-menopáusicas, bem como uma redução deste risco com o tratamento de reposição hormonal. Os fitoestrógenos, além de compartilharem alguns mecanismos neuroprotetores atribuídos aos estrógenos endógenos, apresentariam a vantagem de serem mais seguros, por não estarem relacionados a aumento no risco carcinogênico. Os resultados obtidos em nosso trabalho apontam uma importante ação neuroprotetora das isoflavonas, isoladas ou associadas, uma vez que foram

capazes de reduzir a apoptose e prevenir a necrose desencadeada pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide. Em conjunto, nossos dados estabelecem as condições ideais para reprodução de um modelo *in vitro* para o estudo da toxicidade do peptídeo  $A\beta_{25-35}$  como modelo de DA, e apontam uma importante atividade neuroprotetora dos fitoestrógenos da soja, por mecanismos ainda a serem elucidados.

## **Introdução**

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva e irreversível da memória e das demais funções cognitivas. Sendo esta uma patologia extremamente complexa, sua patogenia ainda não foi suficientemente elucidada. A cascata amilóide é uma das principais hipóteses proposta para a patogenia da DA, consistindo na produção e no depósito extracelular de um peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ). Este peptídeo, uma vez formado, pode permanecer na forma monomérica ou seguir um processo de agregação que leva à formação de oligômeros ou fibrilas, estas envolvidas na formação das placas senis. Os peptídeos  $A\beta$  endógenos são compostos por resíduos de 39-43 aminoácidos. Entretanto, o fragmento contendo os resíduos 25-35 deste peptídeo ( $A\beta_{25-35}$ ) parece desencadear mecanismos similares de neurotoxicidade (El Khoury et al., 1996; Yan et al., 1996; Guan et al., 2001; Qi et al., 2005; Frozza et al., 2009) e, assim como os peptídeos  $A\beta$  endógenos, é capaz de se agregar na forma de fibrilas (Kowall et al., 1992). Por este motivo, o  $A\beta_{25-35}$  tem sido bastante utilizado para a investigação dos mecanismos neurotóxicos envolvidos na DA.

Dentre os principais fatores de risco associados à DA, a idade é a que exerce maior influência, entretanto, o sexo feminino parece também estar associado. Além disso, baixos níveis de estrógenos em mulheres em período pós-menopausa tem sido relacionados ao maior risco de desenvolvimento da DA (Craig and Murphy, 2009). Considerando que estrógenos apresentam atividade antioxidante - prevenindo o dano



peroxidativo a lipídios, proteínas e/ou DNA -, a utilização da terapia de reposição de estrógenos tem sido estimulada como medida de prevenção aos danos degenerativos associados à idade. Estudos sugerem que mulheres em pós-menopausa sob terapia de reposição estrogênica apresentariam menor risco de desenvolvimento da DA, embora a utilização a longo prazo desta terapia esteja associada ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama (Tang et al., 1996; Craig and Murphy, 2010; Janicki et al., 2010).

Isoflavonas são fitoestrógenos naturais encontrados em grãos de soja e em seus derivados, estruturalmente semelhantes a estrógenos endógenos e que podem ligar-se diretamente a receptores estrogênicos (Sun et al., 2008; Campos-Esparza et al., 2009). Genisteína e daidzeína estão entre as isoflavonas presentes em maior proporção na soja (Park et al., 2001). Considerando que os fitoestrógenos compartilham atividades antioxidantes e neuroprotetoras semelhantes às dos estrógenos sintéticos, sem, contudo, estarem associados ao risco carcinogênico, alimentos e/ou suplementos a base de soja ou de seus fitoestrógenos tem sido propostos como uma possível alternativa terapêutica na prevenção ou no retardo do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DA (Jin et al., 2007).

Células SH-SY5Y tem sido bastante utilizadas como modelo para o estudo de neurodegeneração e neuroproteção. Embora estas células encontrem-se em estágios iniciais da diferenciação neuronal, sendo caracterizadas bioquimicamente pela escassez de marcadores neuronais (Biedler et al., 1978; Gilany et al., 2008; Lopes et al., 2010), elas podem ser diferenciadas morfológica e bioquimicamente, adquirindo fenótipo semelhante ao de um neurônio, em resposta a agentes específicos como, por exemplo, o ácido retinóico (AR) (Pahlman et al., 1984; Miloso et al., 2004). Ainda que já se tenha bem estabelecido protocolos para a diferenciação destas células, e que haja dados indicando que a vulnerabilidade destas a alguns agentes neurotóxicos seja aumentada pelo processo de diferenciação (Zimmermann et al., 2004; Li et al., 2010; Lopes

et al., 2010; da Frota et al., 2011), não se dispõe de trabalhos avaliando o efeito da diferenciação por AR sobre a vulnerabilidade de células SH-SY5Y ao peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub>, bem como sobre a influência de fatores como o tempo de diferenciação, a concentração e o tempo de exposição ao A $\beta$ , ou estado de agregação deste peptídeo (fibrilado ou não fibrilado).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo estabelecer e padronizar um modelo *in vitro* para o estudo da toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub>, utilizando a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y, além de avaliar a ação neuroprotetora das isoflavonas da soja, genisteína e daidzeína, isoladas ou em associação, em diferentes concentrações sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub>.

## **Métodos**

### ***Cultura celular e diferenciação***

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC<sup>®</sup> n<sup>o</sup> CRL-2266<sup>TM</sup>) foram mantidas em mistura 1:1 de Ham's F12 e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco<sup>®</sup>) suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion<sup>®</sup>), 26  $\mu$ M de bicarbonato de sódio (Merck<sup>®</sup>), gentamicina 0,28  $\mu$ g/ $\mu$ L e anfotericina B 1  $\mu$ L/mL, em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias e as células foram subcultivadas ao atingirem 90% de confluência.

Para os ensaios de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços à densidade de 5x10<sup>4</sup> células por poço. Vinte e quatro horas após o plaqueamento foi iniciada a diferenciação das células por meio da redução para 1% de SFB (Cripion<sup>®</sup>) e da adição de 10  $\mu$ M de ácido retinóico (AR) (Enzo Life Sciences<sup>®</sup>) ao meio de cultivo durante 4 ou 7 dias. O meio de diferenciação foi trocado a cada 2 dias para reposição do AR (Lopes et al., 2010). Para fins de estudo da toxicidade do peptídeo A $\beta$  em células não diferenciadas, a exposição ao peptídeo iniciou-se 24h após o plaqueamento das células.

### ***Preparação do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> e das isoflavonas***

Soluções estoque de A $\beta$ <sub>25-35</sub> (Sigma®) foram preparadas em água destilada estéril e armazenadas em volumes menores a -20°C. Para a obtenção da forma fibrilada do peptídeo A $\beta$ , alíquotas da solução estoque foram incubadas por 5 dias a 37°C. O A $\beta$  não fibrilado corresponde ao peptídeo não submetido ao processo recém descrito, sendo, então, adicionado à cultura diretamente da solução estoque (Frezza et al., 2009; Kreutz et al., 2011).

Soluções estoque de genisteína e daidzeína (Sigma®) foram preparadas em DMSO (Sigma®). A partir destas, foram, então, diluídas às soluções de uso, as quais permitissem, uma vez adicionadas às culturas, a obtenção das concentrações finais requeridas para as isoflavonas (1 nM ou 10 nM) e para o veículo DMSO (0,1%) (Jin et al., 2007).

### ***Padronização do modelo***

A fim de padronizar as condições ideais para indução de toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> em células SH-SY5Y, foram avaliadas e comparadas quatro variáveis: (1) fenótipo celular (proliferativo ou diferenciado por 4 e 7 dias); (2) concentração do peptídeo (7,5, 25, e 35 ou 50 $\mu$ M); (3) tempo de exposição ao peptídeo (48 ou 72h); e (4) estado de agregação do peptídeo (fibrilado ou não fibrilado) (Fig. 1).

Células proliferativas ou diferenciadas por 4 e 7 dias com AR foram expostas ao peptídeo somente no estado fibrilado, nas diferentes concentrações, por 48 ou 72h a 37°C. Para isso, o peptídeo fibrilado foi adicionado 24h após o plaqueamento (para células proliferativas) ou ao término da diferenciação (4° ou 7° dias) (Fig. 1A).

Na sequência, avaliou-se a influência do estado de agregação do peptídeo nos fenótipos celulares e no tempo de exposição ao peptídeo A $\beta$  que mostraram diferença significativa na viabilidade celular nos experimentos anteriores. Para isso, avaliaram-se diferentes concentrações (7,5, 25 e 50  $\mu$ M) dos peptídeos A $\beta$  fibrilado e não fibrilado (Fig. 1B).

### ***Tratamento das células com A $\beta$ <sub>25-35</sub> e isoflavonas***

A possível ação neuroprotetora das isoflavonas frente ao dano causado pelo peptídeo A $\beta$  foi avaliada por dois diferentes parâmetros: concentração e associação. Quanto à concentração, tanto genisteína quanto daidzeína foram utilizadas nas concentrações de 1 e 10 nM (Bang et al., 2004; Jin et al., 2007). Além disso, foi avaliado o efeito da associação entre estas duas isoflavonas nas concentrações de 1:1 e 10:10 nM. As diferentes concentrações e associações destas drogas foram adicionadas ao meio 24h antes da exposição ao peptídeo A $\beta$  e mantidas durante a exposição deste.

### ***Análise de viabilidade celular por MTT, PI e Hoechst***

Os primeiros experimentos de viabilidade celular para a determinação do fenótipo celular, da concentração experimental tóxica do A $\beta$ <sub>25-35</sub>, e do tempo de exposição ao peptídeo foram avaliados por meio da quantificação da redução de MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma®) a um produto azul/violeta de cristais de formazan pelas desidrogenases celulares (Fang et al., 2005). Ao final dos tratamentos, o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo 0,5 mg/mL de MTT e incubado por 1h a 37°C. DMSO (Sigma®) foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi medida a 560 e 630 nm no aparelho SoftMax Pro Microplate Reader (Molecular Devices, USA).

O efeito do estado de agregação do peptídeo foi avaliado por meio dos métodos da redução de MTT e da incorporação de iodeto de propídeo (PI) (Sigma®), em experimentos independentes. Para o ensaio de morte celular, 5  $\mu$ M de PI foi adicionado ao meio ao final dos tratamentos, e após 1h de incubação, as células foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) usando filtro de rodamina. As imagens foram capturadas e então analisadas utilizando o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As células que apresentaram forte fluorescência devido à incorporação de PI e as células totais foram contadas, e o percentual de morte foi obtido pela relação percentual entre as mesmas.

### ***Avaliação do efeito neuroprotetor das isoflavonas***

A morte celular para os experimentos de avaliação da possível atividade neuroprotetora das isoflavonas frente ao peptídeo A $\beta$  foi avaliada por meio da análise da captação do PI e do Hoechst 33342 (HO) (Invitrogen®) (Macklis and Madison, 1990). Ao final dos tratamentos, adicionou-se 5  $\mu$ M de PI e 5 $\mu$ g/ml de HO ao meio, respeitando o tempo de incubação de 1h para o PI e 20 minutos para o HO.

Após o tempo de incubação, as células foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300). Estas duas diferentes imagens (PI e HO) foram capturadas e, então, analisadas quantitativa e qualitativamente com o software Image J. Com a sobreposição das imagens, as células foram classificadas da seguinte maneira: vivas (núcleo azul claro corado somente pelo HO), apoptóticas (núcleo azul brilhante corado pelo HO com corpos apoptóticos) e necróticas (núcleo vermelho esférico ou em vesículas corado pelo PI e citoplasma vermelho). A apoptose foi, ainda, subclassificada como inicial (núcleo azul brilhante) e tardia (núcleo azul brilhante e vermelho = rosa). Foi estabelecido o percentual de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose, levando-se em consideração a morfologia e a coloração das células.

### ***Análise estatística***

Os dados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido por teste de Duncan quando valor de  $F$  foi significativo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa de estatística para as ciências sociais (SPSS) em um computador compatível. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um  $p < 0,05$ .

## Resultados

### ***Toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> fibrilado em células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas***

A toxicidade do peptídeo no tempo de exposição de 48h com diferentes concentrações do A $\beta$  fibrilado foi avaliada comparando-se células proliferativas, diferenciadas por 4 dias ou diferenciadas por 7 dias. Não foi observada diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos testados, indicando que, com este tempo de exposição, o peptídeo A $\beta$  não produziu toxicidade avaliável por MTT, quer em células proliferativas ou em células diferenciadas por 4 e 7 dias (Fig. 2).

A toxicidade do peptídeo no tempo de exposição de 72h com diferentes concentrações de A $\beta$  fibrilado, comparando-se células proliferativas, diferenciadas por 4 dias ou diferenciadas por 7 dias também foi avaliada. Observou-se que em células proliferativas, este tempo de tratamento apenas causou morte celular detectável por MTT na concentração de 25  $\mu$ M (17,12%  $\pm$  4,6). Em células diferenciadas por 4 dias, nenhuma das concentrações de A $\beta$  foi capaz de reduzir a viabilidade celular. Em contrapartida, células diferenciadas por 7 dias tiveram sua viabilidade celular reduzida após exposição às três concentrações do peptídeo A $\beta$  fibrilado usadas, embora estas três concentrações não tenham mostrado diferença significativa entre si. (Fig. 3). Este dado nos leva a supor que para este parâmetro (viabilidade mitocondrial), o efeito tóxico do peptídeo A $\beta$  fibrilado já esteja em seu platô nas concentrações mais baixas testadas. Além disso, o tamanho amostral não permitiu observar diferença significativa na viabilidade celular com a concentração de 25  $\mu$ M de A $\beta$  fibrilado entre as células proliferativas e as células diferenciadas por 7 dias, embora exista uma tendência a maior morte em células diferenciadas. Observou-se, ainda, que o processo de diferenciação parece aumentar a vulnerabilidade das células frente ao peptídeo, visto que depois de diferenciadas por 7 dias, mesmo a menor concentração de A $\beta$  fibrilado já causa significativa redução da viabilidade celular.

***Toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> fibrilado e não fibrilado durante 72h de exposição em células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas por 7 dias***

Como a exposição por 72h com o peptídeo A $\beta$  permitiu observar diferenças na viabilidade de células proliferativas e diferenciadas por 7 dias, foi realizada a avaliação do efeito do estado de agregação do peptídeo (fibrilado ou não fibrilado) nestes dois diferentes fenótipos. Observou-se que tanto em células proliferativas quanto em células diferenciadas, apenas a forma fibrilada do peptídeo ocasionou alteração na viabilidade celular detectável pelo teste do MTT (Fig. 4). A análise da incorporação de PI (Fig. 5 e Fig. 6) mostrou que células diferenciadas por 7 dias foram mais sensíveis ao efeito do peptídeo fibrilado do que as células proliferativas. Estes resultados confirmam os dados já observados no item anterior (Fig. 3). Além disso, verificou-se que as células proliferativas se mostraram vulneráveis ao peptídeo no estado não fibrilado apenas em sua maior concentração, enquanto que as células diferenciadas por 7 dias apresentaram vulnerabilidade nas três concentrações utilizadas do peptídeo.

A partir destes resultados, padronizou-se o modelo da seguinte maneira: células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico durante 7 dias, expostas por 72h ao peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> fibrilado na concentração de 25  $\mu$ M (Fig. 7). Os experimentos subsequentes foram realizados sob estas condições.

***Avaliação do efeito neuroprotetor das isoflavonas da soja na morte celular induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub>***

Levando em consideração dados da literatura que propõem atividade neuroprotetora a isoflavonas da soja em diferentes modelos experimentais, foram avaliados os efeitos da genisteína e da daidzeína sobre a toxicidade do peptídeo A $\beta$  no modelo descrito neste trabalho. Para isso, estas isoflavonas foram adicionadas ao meio de cultura de forma isolada ou associada nas concentrações de 1, 10, 1:1 e 10:10 nM. O tratamento com as isoflavonas seguiu o seguinte regime: adição das drogas

ao meio de cultura 24h antes da exposição ao peptídeo A $\beta$  e reposição das mesmas no momento da incubação com o peptídeo (Fig. 8).

A partir da avaliação das imagens resultantes da utilização de PI e HO (Fig. 9, Fig. 10 e Tabela 1) observou-se que o grupo exposto somente ao peptídeo A $\beta$  apresentou maior número de células em necrose e apoptose tardia, tendo, conseqüentemente, maior número de células mortas ou em processo de morte em comparação ao grupo controle. Quando avaliado o efeito das isoflavonas genisteína e daidzeína sobre a toxicidade do peptídeo A $\beta$ , observou-se que: (1) em relação à necrose, todas as drogas, isoladas ou associadas, protegeram igual e totalmente as células; (2) quanto à apoptose tardia, todos os grupos tratados com isoflavonas mostraram-se diferentes do grupo exposto somente ao peptídeo A $\beta$ , embora também fossem diferentes do grupo controle, indicando uma prevenção parcial das isoflavonas frente aos danos do peptídeo A $\beta$ ; (3) quanto à apoptose inicial, os grupos “A $\beta$  + genisteína 1 nM”, “A $\beta$  + genisteína 10 nM”, “A $\beta$  + daidzeína 10 nM” e “A $\beta$  + genisteína 10 nM + daidzeína 10 nM” mostraram-se diferentes do controle; (4) em relação à morte total, todas as drogas (isoladas ou associadas) mostraram-se diferentes do grupo exposto somente ao A $\beta$ , embora fossem também diferentes do grupo controle.

### ***Caracterização da morte celular desencadeada pelos diferentes tratamentos***

A exposição das células diferenciadas por 72 h ao peptídeo A $\beta$  causou um aumento significativo na morte celular total. A análise da incorporação de PI e marcação com HO permitiu avaliar o perfil de morte celular desencadeado pelo A $\beta_{25-35}$  neste modelo. Como pode ser verificado nas figuras 8 e 9, e de forma mais evidente na tabela 1, o peptídeo desencadeia majoritariamente processo de apoptose, encontrando-se 1,79% ( $\pm 0,256$ ) das células expostas ao A $\beta$  em estágio de apoptose inicial, e 42,25% ( $\pm 2,878$ ) em apoptose tardia. A necrose, embora também tenha participação no processo de morte celular desencadeada pelo peptídeo, representa pouco mais do que 5% das células em processo de morte.



## Discussão

O peptídeo A $\beta$  é um produto da clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP), sendo identificado como um importante componente das placas senis em cérebros de pacientes com DA. Embora esta não seja a única alteração bioquímica presente nesta patologia, a produção deste peptídeo, o qual pode permanecer em formas solúveis ou ser convertido a formas insolúveis (fibrilas), parece ser um ponto importante no desenvolvimento e na progressão da doença (Suh and Checler, 2002; Wash and Selkoe, 2007). Vários peptídeos A $\beta$  tem sido utilizados para o estudo de seus mecanismos de toxicidade em linhagens celulares, culturas primárias ou organotípicas. Entre os peptídeos sintéticos estudados, o A $\beta$ <sub>25-35</sub> representa um fragmento do A $\beta$  processado *in vivo* por proteases cerebrais, com níveis significativos de agregação molecular, mantendo, assim, a toxicidade do peptídeo endógeno (Kubo et al., 2002; Clementi et al., 2005). Além disso, propõe-se que este fragmento represente a região biologicamente ativa do peptídeo endógeno A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Pike et al., 1995). Em trabalho realizado com o objetivo de comparar os peptídeos A $\beta$ <sub>25-35</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub> em modelo de cultura organotípica (Frezza et al., 2009), observou-se que na concentração de 25  $\mu$ M estes dois peptídeos induziram morte celular e ativação da caspase-3, proteína chave no processo de apoptose, de maneira semelhante após exposição de 48h. Por estes motivos, o peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> tem sido muito utilizado em pesquisas tanto *in vivo* quanto *in vitro* para o estabelecimento de modelos da DA (Misiti et al., 2005; Kosuge et al., 2006; Nassif et al., 2007).

Dentre os diferentes modelos para o estudo da DA, a utilização da linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), com exposição ao peptídeo A $\beta$  (Zampagni et al., 2010) tem ganhado destaque. Por ser facilmente diferenciável a neurônios através do tratamento com AR (Lopes et al., 2010), e por se tratar de uma linhagem humana, o emprego de células SH-SY5Y diferenciadas configura-se em uma ferramenta importante para a pesquisa de drogas neuroprotetoras e para a elucidação de doenças neurodegenerativas como a DA. Embora diversos trabalhos tenham utilizado

esta linhagem celular como modelo para esta patologia (Bang et al., 2004; Suresh et al., 2012; Qu et al., 2011), nenhum deles comparou ou padronizou as condições ideais de utilização deste modelo referentes ao tempo de exposição ao peptídeo e seu estado de agregação. Dessa forma, este trabalho teve como primeiro objetivo comparar a vulnerabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas ou proliferativas frente à toxicidade do A $\beta$ <sub>25-35</sub>, e definir as condições ideais para reprodução do modelo.

Primeiramente, foi avaliada a toxicidade do peptídeo A $\beta$  fibrilado em diferentes concentrações (7,5, 25 e 35  $\mu$ M) no tempo de 48h em células proliferativas e diferenciadas por 4 e 7 dias. Observou-se que este tempo de exposição ao A $\beta$  não foi capaz de produzir toxicidade (pelo menos a avaliada pelo método do MTT) em qualquer um dos fenótipos celulares utilizados. Embora este tempo de exposição ao peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> seja suficiente para causar morte celular em culturas organotípicas de hipocampo de rato (Frezza et al., 2009; Kreutz et al., 2010), o mesmo não foi encontrado para esta linhagem celular em qualquer um dos fenótipos.

Com a exposição dos mesmos fenótipos celulares ao peptídeo por 72h, observou-se a morte de células proliferativas somente com a concentração de 25  $\mu$ M de A $\beta$ , enquanto que células diferenciadas por 7 dias foram igualmente sensíveis às diferentes concentrações do peptídeo. Entretanto, células diferenciadas por 4 dias não tiveram sua viabilidade celular reduzida por nenhuma das concentrações do A $\beta$  neste tempo de exposição. Estes resultados permitem a conclusão de que o processo de diferenciação celular com o uso do AR aumente a vulnerabilidade destas células aos efeitos do A $\beta$ , já que mesmo a concentração mais baixa do peptídeo induziu redução da viabilidade celular. Este resultado reforça os dados obtidos por Lopes e colaboradores (2010) em que foi comparada a vulnerabilidade destas células nos estados proliferativo e diferenciado (por 4, 7 e 10 dias) frente à toxicidade da 6-hidroxiopamina (6-OHDA) para modelo de estudo da doença de Parkinson. Neste caso, somente as células diferenciadas por 7 e 10 dias mostraram redução significativa de sua viabilidade, indicando, assim, serem mais suscetíveis a esta neurotoxina.

Uma vez definidos os fenótipos celulares (proliferativo e diferenciado por 7 dias) e o tempo de exposição (72h) ao peptídeo A $\beta$  que provocaram diferenças significativas na morte das células, foi realizada, ainda, a comparação entre os diferentes estados de agregação do peptídeo (formas fibrilada ou não fibrilada). Como nos experimentos anteriores não foi observada diferença significativa entre as concentrações de 25 e 35  $\mu$ M de A $\beta$ , optou-se por aumentar a maior concentração utilizada do peptídeo para 50  $\mu$ M para que pudessem ser detectadas maiores diferenças no efeito do peptídeo sobre os parâmetros avaliados. Foi observada relativa diferença entre os resultados obtidos por meio do método da redução do MTT e da incorporação de PI. O método do MTT mostrou que somente a forma fibrilada do peptídeo provocou a redução na viabilidade de células proliferativas ou diferenciadas por 7 dias. Já a incorporação de PI, mostrou que as células diferenciadas por 7 dias foram mais vulneráveis à toxicidade do peptídeo do que as células proliferativas em quaisquer concentrações ou estado de agregação. Além disso, observou-se que nas células diferenciadas por 7 dias, a forma fibrilada do peptídeo promoveu maior toxicidade, especificamente nas concentrações de 7,5 e 25  $\mu$ M, quando comparada à forma não fibrilada. Por outro lado, nas células proliferativas, o peptídeo foi capaz de promover toxicidade apenas na concentração de 50  $\mu$ M, em sua forma não fibrilada.

Uma vez padronizadas as condições ideais de utilização do modelo (células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico durante 7 dias, expostas por 72h ao peptídeo A $\beta_{25-35}$  fibrilado na concentração de 25  $\mu$ M), foi investigado o possível efeito neuroprotetor de isoflavonas da soja sobre a toxicidade desencadeada por este peptídeo.

Como resultado, foi observado que todos os tratamentos com as isoflavonas, isoladas ou associadas, mostraram-se efetivos na prevenção da morte celular, pelo menos de forma parcial. Observou-se também que esta prevenção deu-se principalmente por meio da redução da necrose e da apoptose tardia em relação ao grupo exposto somente ao peptídeo A $\beta$ . Por outro lado, a maioria destes tratamentos provocou aumento na apoptose

inicial das células, o que pode ser interpretado como uma consequência do retardo, induzido pelas drogas, no processo apoptótico. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Bang e colaboradores (2004), em que esta mesma linhagem celular foi protegida pela genisteína nas concentrações de 1 e 10 nM quando expostas ao peptídeo A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub>), embora este efeito tenha se mostrado melhor na concentração de 1 nM. Não foi encontrado trabalho na literatura avaliando a concentração ideal de utilização de genisteína e daidzeína para a prevenção da toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub>, assim como não há trabalhos diferenciando o tipo de morte celular prevenido com estes tratamentos.

Dessa maneira, o modelo aqui padronizado representa uma importante ferramenta para o estudo da neurodegeneração associada à DA, ampliando a gama de abordagens experimentais disponíveis para o estudo de drogas neuroprotetoras.

Além disso, os dados referentes ao efeito das isoflavonas sugerem fortemente a possibilidade de que estas venham a ser estudadas como alternativas para o tratamento da DA.

### **Agradecimentos**

Este trabalho teve suporte financeiro do CNPq tanto para os insumos como para as bolsas dos autores FSP (Iniciação Científica), FK (Doutorado), LFP (PNPD) e VMTT (Pesquisador). Os autores agradecem ao Dr Fábio Klamt por ceder as células SH-SY5Y, a Dra Fátima TCR Guma por gentilmente fornecer os corantes Hoechst e iodeto de propídeo, ao PPGCB-Bioquímica e ao Departamento de Bioquímica, ICBS, pelo apoio financeiro parcial ao projeto.

### **Referências**

Bang OY, Hong HS, Kim DH, Kim H, Boo JH, Huh K, Mook-Jung I; Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2004, 6(1):21-28.

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS: Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 1978, 38: 3751–3757.

Campos-Esparza MR, SánchezGómez MV, Matute C: Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium* 2009, 45:358–368

Clementi ME, Marini S, Coletta M et al: Ab(31-35) and Ab(25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: role of the redox state of methionine-35. *FEBS Lett* 2005, 579:2913–2918.

Craig MC, Murphy DG: Alzheimer's disease in women. *Best Pract. Res Clin Obstet Gynaecol* 2009, 23:53-61.

Craig MC, Murphy DG: Estrogen therapy and Alzheimer's dementia. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1205:245-253.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD: Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta amyloid fibrils. *Nature* 1996, 382: 716–719.

da Frota Junior ML, Pires AS, Zeidán-Chuliá F, Bristot IJ, Lopes FM, de Bittencourt Pasquali MA, Zanotto-Filho A, Behr GA, Klamt F, Gelain DP, Moreira JC: In vitro optimization of retinoic acid-induced neurogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Mol Cell Biochem* 2011, 358(1-2):325-34.

Fang F, Wang AP, Yang SF: Antitumor activity of a novel recombinant mutant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Acta pharmacol Sin* 2005, 26: 1373–1381.

Frezza R L, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA, Salbego CG: A Comparative Study of  $\beta$ -Amyloid Peptides A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 25-35 Toxicity in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Neurochem Res* 2009, 34: 295–303.

Gilany K, Elzen RV, Mous K, Coen E, Dongen WV, Vandamme S, Gevaert K, Timmerman E, Vandekerckhove J, Dewilde S, Ostade XV, Moens L: The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: an enlarged proteome. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1784: 983–985.

Guan ZZ, Miao H, Tian J Y, Unger C, Nordberg A, Zhang X: Suppressed expression of nicotinic acetylcholine receptors by nano molar beta-amyloid peptides in PC12 cells. *J Neural Transm* 2001,108: 1417–1433.

Janicki SC, Schupf N: Hormonal influences on cognition and risk for Alzheimer disease. *Curr. Neurol Neurosci Rep* 2010,10 (5):359-366.

Jin Y, Wu H, Cohen EM, Wei J, Jin H, Prentice H, Wu J: Genistein and daidzein induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures. *J Biomed Sci* 2007, 14:275-284.

Kubo T, Nishimura S, Kumagae Y et al: In vivo conversion of Racemized<sub>-</sub>-Amyloid([D-Ser26]A<sub>1-40</sub>) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A<sub>25-35/40</sub>) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res* 2002, 70:474-483.

Kosuge Y, Sakikubo T, Ishige K et al.: Comparative study of endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death in rat cultured hippocampal and cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 2006, 49:285-293

Kowall NW, McKee AC, Yankner BA, Beal MF: In vivo neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1-40)] and the beta(25-35) fragment. *Neurobiol Aging* 1992, 13 (5), 537-542.

Kreutz F, Frozza RL, Breier AC, de Oliveira VA, Horn AP, Pettenuzzo LF, Netto CA, Salbego CG, Trindade VM: Amyloid- $\beta$  induced toxicity involves ganglioside expression and is sensitive to GM1 neuroprotective action. *Neurochem Int* 2011, 59 (5):648-55.

Li Q, Wu D, Zhang L, Zhang Y.: Effects of galantamine on  $\beta$ -amyloid release and beta-site cleaving enzyme 1 expression in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Exp Gerontol* 2010, 45(11):842-847.

Lopes FM, Schröder R, da Frota ML Jr, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes M da C, Klamt F: Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res* 2010, 14:1337:85-94.

Macklis JD, Madison RD: Progressive incorporation of propidium iodide in culture mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Meth* 1990, 31:43-46.

Miloso M, Villa D, Crimi M, Galbiati S, Donzelli E, Nicolini G, Tredici G: Retinoic acid-induced neurogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J Neurosci Res* 2004, 75: 241-252.

Misiti F, Sampaiolese B, Pezzotti M et al.: Ab(31-35) peptide induce apoptosis in PC12 cells: contrast with Ab(25-35) peptide and examination of underlying mechanisms. *Neurochem Int* 2005, 46:575-583.

Nassif M, Hoppe J, Santin K et al b-Amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/ PKB, GSK-3 $\beta$ , and PTEN. *Neurochem Int* 2007, 50:229-235

Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson M E, Esscher, T: Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differ* 1984, 14:135–144.

Park YK, Aguiar CL, Alencar SM, Mascarenhas HAA, Scamparini ARP: Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. *Ciência y Tecnologia Alimentaria* 2001, 3:156-160.

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J et al.: Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 1995, 64:253–265.

Qi X L, Xiu J, Shan KR, Xiao Y, Gu R, Liu, RY, Guan, Z Z: Oxidative stress induced by beta-amyloid peptide (1–42) is involved in the altered composition of cellular membrane lipids and the decreased expression of nicotinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 2005, 46 (8), 613–621.

Qu M, Zhou Z, Chen C, Li M, Pei L, Yang J, Wang Y, Li L, Liu C, Zhang G, Yu Z, Wang D.: Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening is involved in the protective effects of mortalin over expression against beta-amyloid-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Neurosci Res* 2012, 72(1):94-102.

Suh Y, Checler F: Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and Alpha-Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease (Review). *Pharmacol Rev* 2002, 54:469-525.

Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY: Botanical Phenolics and Brain Health. *Neuromol Med* 2008, 10:259–274.

Suresh C, Johnson J, Mohan R, Chetty CS.: Synergistic effects of amyloid peptides and lead on human neuroblastoma cells. *Cell Mol Biol Lett* 2012, 17(3):408-421.

Tang M, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R: Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996, 348:429-432.

Walsh DM, Selkoe DJ: A $\beta$  Oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem* 2007, 101:1172–1184.

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu HJ, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt A M, RAGE and amyloid- $\beta$  peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996, 382:685–691.

Zampagni M, Evangelisti E, Cascella R, Liguri G, Becatti M, Pensalfini A, Uberti D, Cenini G, Memo M, Bagnoli S, Nacmias B, Sorbi S, Cecchi C: Lipid rafts are primary mediators of amyloid oxidative attack on plasma membrane. *J Mol Med* 2010, 88:597–608.

Zimmermann M, Gardoni F, Marcello E, Colciaghi F, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F, Di Luca M: Acetylcholinesterase inhibitors increase ADAM10 activity by promoting its trafficking in neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 2004, 90(6):1489-1499.



## LEGENDAS DAS FIGURAS

**Figura 1. Fluxograma da padronização do modelo experimental.** (A) *Avaliou-se a morte celular, medida por MTT, do peptídeo A $\beta$  em diferentes concentrações, nos tempos de tratamento de 48 ou 72h, em células proliferativas, diferenciadas com ácido retinóico por 4 ou 7 dias.* (B) *Uma vez definidas as condições experimentais para reprodução da toxicidade do peptídeo (células proliferativas e/ou diferenciadas e tempo de exposição ao peptídeo Abeta), procedeu-se à comparação entre os estados de agregação do peptídeo Abeta (fibrilado e não fibrilado).*

**Figura 2. Efeito da exposição por 48h do peptídeo A $\beta$  fibrilado sobre viabilidade de células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas.** *Células proliferativas e diferenciadas por 4 ou 7 dias com ácido retinóico foram expostas ao peptídeo A $\beta$  fibrilado (Abeta) durante 48h, período após o qual a morte celular foi avaliada por ensaio de MTT. Análise quantitativa da viabilidade celular. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão.*

**Figura 3. Efeito da exposição por 72h do peptídeo A $\beta$  fibrilado sobre viabilidade de células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas.** *Células proliferativas e diferenciadas por 4 ou 7 dias com ácido retinóico foram expostas ao peptídeo A $\beta$  fibrilado (Abeta) durante 72h, período após o qual a morte celular foi avaliada por ensaio de MTT. Análise quantitativa da viabilidade celular. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. \* = significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ )*

**Figura 4. Efeito da exposição dos peptídeos A $\beta$  fibrilado e não fibrilado sobre viabilidade de células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas.** *Células proliferativas ou diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico foram expostas a diferentes concentrações dos peptídeos A $\beta$  (Abeta) fibrilado ou não fibrilado, durante 72h, período após o qual, a morte celular foi avaliada por ensaio de MTT. Análise quantitativa da viabilidade celular. As barras*

representam a média  $\pm$  erro padrão. \* = significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ )

**Figura 5. Fotos representativas do efeito da exposição por 72h dos peptídeos A $\beta$  fibrilado e não fibrilado sobre a morte de células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas por 7 dias.** Células proliferativas ou diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico foram expostas a diferentes concentrações dos peptídeos A $\beta$  (Abeta) fibrilado ou não fibrilado, e após 72h de exposição, a morte celular foi avaliada por captação de PI.

**Figura 6. Efeito da exposição por 72h dos peptídeos A $\beta$  fibrilado e não fibrilado sobre a morte de células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas por 7 dias.** Células proliferativas ou diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico foram expostas a diferentes concentrações dos peptídeos A $\beta$  (Abeta) fibrilado ou não fibrilado, e após 72h de exposição, a morte celular foi avaliada por captação de PI. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão; a= significativamente diferente do grupo Abeta não fibrilado 25 $\mu$ M em células proliferativas; b= significativamente diferente do grupo Abeta não fibrilado 7,5 $\mu$ M em células diferenciadas por 7 dias; c= significativamente diferente do grupo Abeta não fibrilado 25 $\mu$ M em células diferenciadas por 7 dias; d= significativamente diferente do grupo abeta fibrilado 7,5  $\mu$ M em células diferenciadas por 7 dias; e= significativamente diferente do grupo abeta fibrilado 25  $\mu$ M em células diferenciadas por 7 dias; f= significativamente diferente do grupo Abeta não fibrilado 7,5 $\mu$ M de células proliferativas; g= significativamente diferente do grupo Abeta não fibrilado 25 $\mu$ M de células proliferativas; h= significativamente diferente do grupo Abeta não fibrilado 50 $\mu$ M em células proliferativas; \*= significativamente diferente do controle; #= significativamente diferente da forma não fibrilada do peptídeo; §= significativamente diferente de todas as concentrações de Abeta fibrilado nas células proliferativa; ( $p < 0,05$ ).

**Figura 7. Definição das condições experimentais para reprodução do modelo.** *Em destaque (\*) estão representadas as condições que permitiram a reprodução da toxicidade do peptídeo A $\beta$ .*

**Figura 8. Delineamento experimental.** (A) *Células foram semeadas em placas de 96 poços, em densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço, e 24 horas após o plaqueamento, o meio foi trocado por meio de diferenciação, contendo ácido retinóico  $10 \mu\text{M}$  e SFB 1%. No 6º dia de diferenciação, iniciou-se o tratamento com as isoflavonas, no 7º dia adicionou-se o peptídeo A $\beta$  (Abeta) em sua forma fibrilada, e no 10º, a morte celular foi avaliada por marcação com PI e HO. (B) Controle morfológico do processo de diferenciação celular.*

**Figura 9. Fotos representativas do efeito neuroprotetor das isoflavonas genisteína e daidzeína.** *Células diferenciadas por 7 dias foram tratadas com isoflavonas associadas ou isoladas a partir do 6º dia de diferenciação. No 7ª dia, o peptídeo A $\beta$  ( $25 \mu\text{M}$ ) foi adicionado às culturas em sua forma fibrilada e após 72h de exposição ao peptídeo, a morte celular foi determinada pela incorporação de PI e/ou marcação com HO. Com a utilização do software ImageJ e por meio da sobreposição das duas imagens obtidas, as células foram classificadas da seguinte maneira: vivas (núcleo azul claro corado somente pelo HO), apoptóticas (núcleo azul brilhante corado pelo HO e corpos apoptóticos) e necróticas (núcleo vermelho esférico ou em vesículas corado pelo PI, citoplasma vermelho). A apoptose foi, ainda, subclassificada como inicial (núcleo azul brilhante) e tardia (núcleo azul brilhante e vermelho = rosa). Foi estabelecido o percentual de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose, levando-se em consideração a morfologia e a coloração das células.*

**Figura 10. Análise quantitativa do efeito neuroprotetor das isoflavonas genisteína e daidzeína.** *Células diferenciadas por 7 dias foram tratadas com isoflavonas associadas ou isoladas a partir do 6º dia de diferenciação.*

No 7<sup>a</sup> dia, o A $\beta$  (Abeta) (25  $\mu$ M) foi adicionado às culturas em sua forma fibrilada e após 72h de exposição ao peptídeo, a morte celular foi determinada pela incorporação de PI e/ou marcação com HO. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da morte total, necrose, apoptose inicial ou tardia. Para facilitar a análise, os indicadores de significância do gráfico referem-se exclusivamente à morte total, enquanto a distinção entre os tipos de morte (necrose, apoptose inicial ou tardia como descrito em Métodos e na legenda da Fig.9) e sua comparação entre os grupos, encontra-se disponível na Tabela 1. \* = Morte total estatisticamente diferente do controle; # = Morte total estatisticamente diferente do grupo Abeta.  $p < 0,05$

## FIGURAS

Figura 1

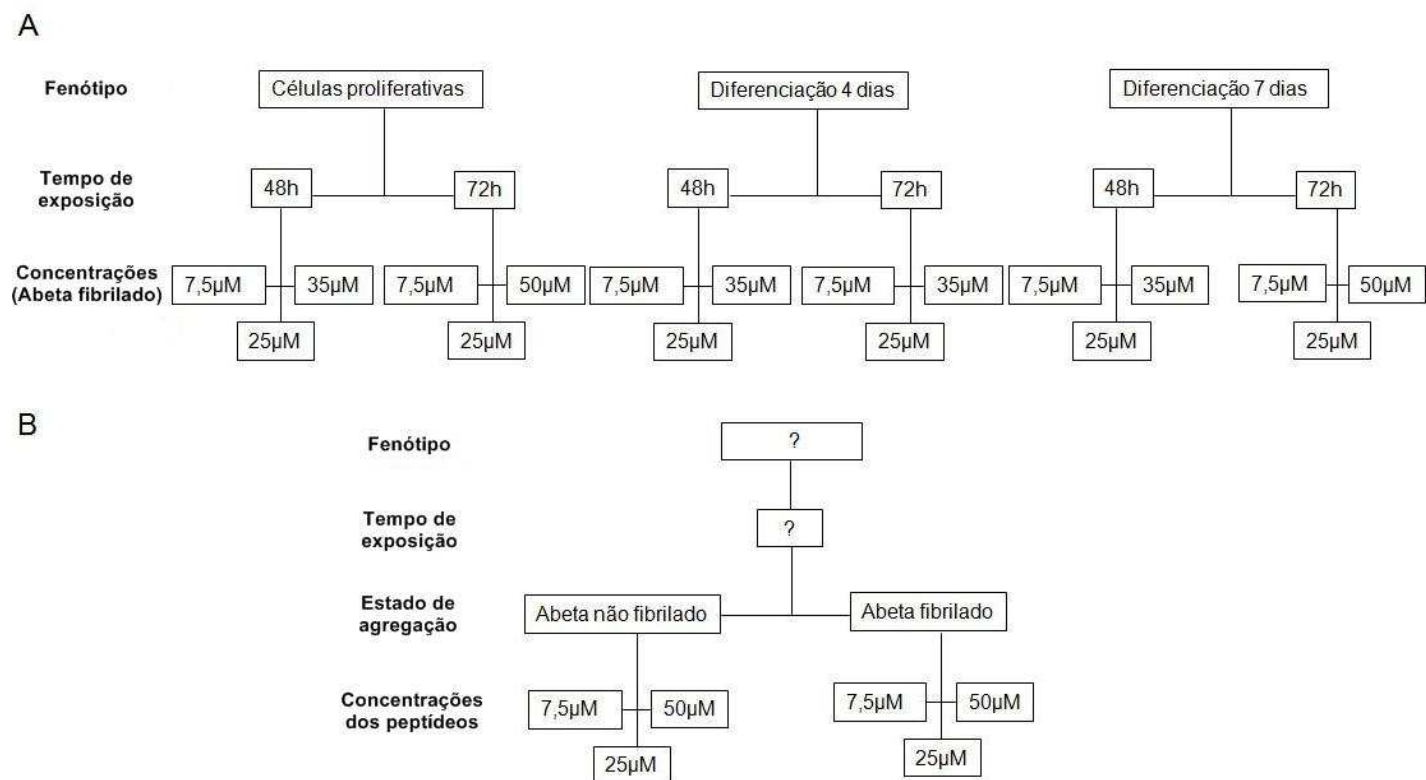


Figura 2

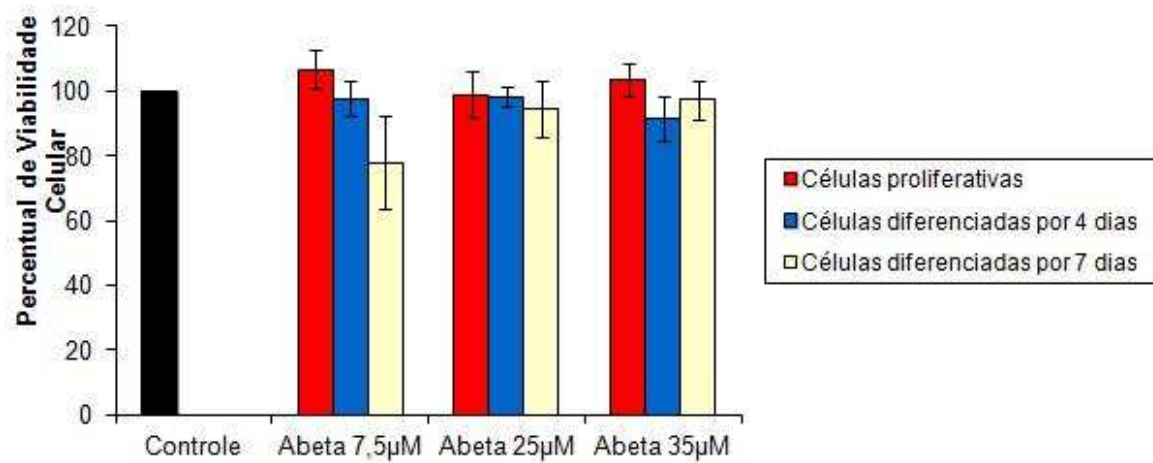


Figura 3

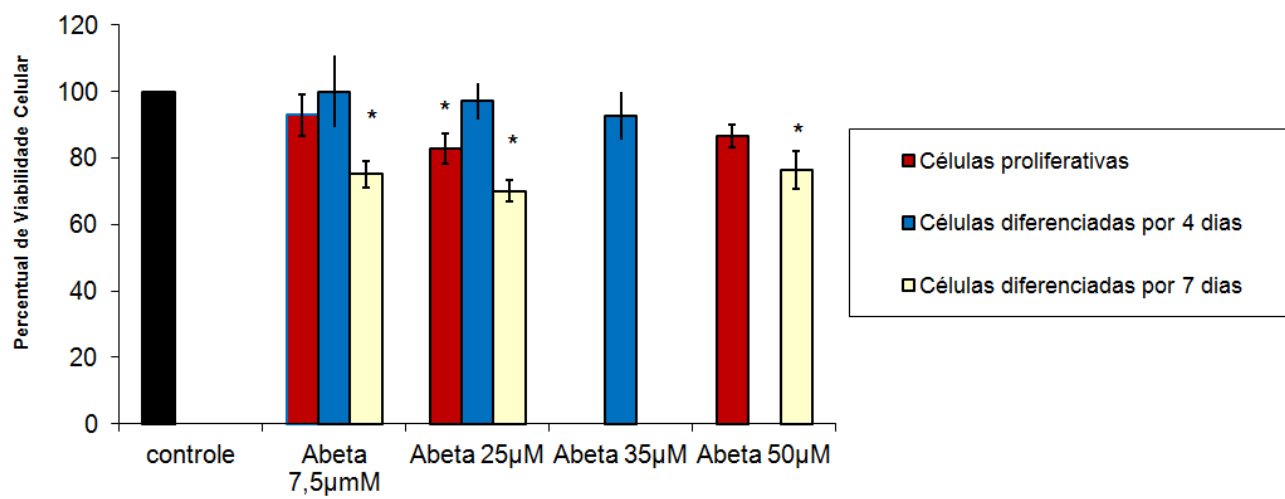


Figura 4

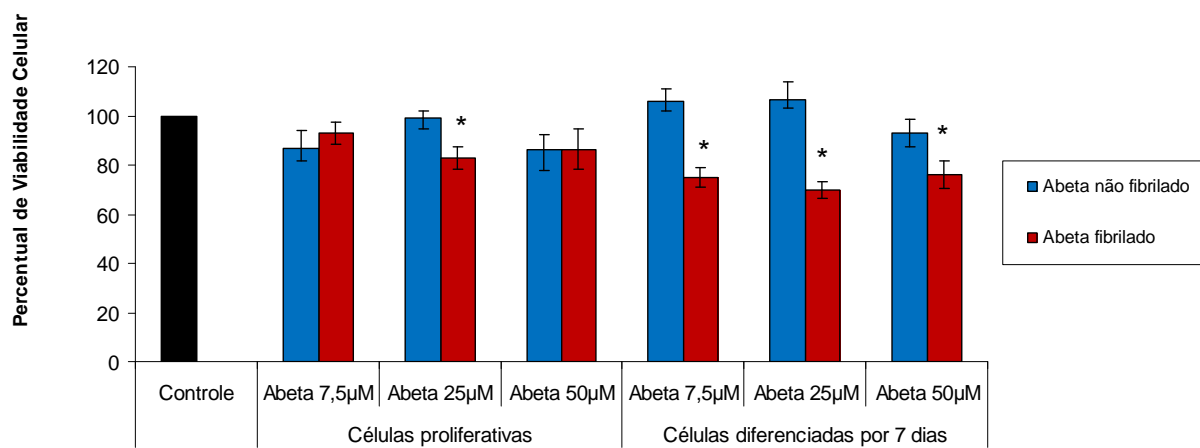




Figura 5

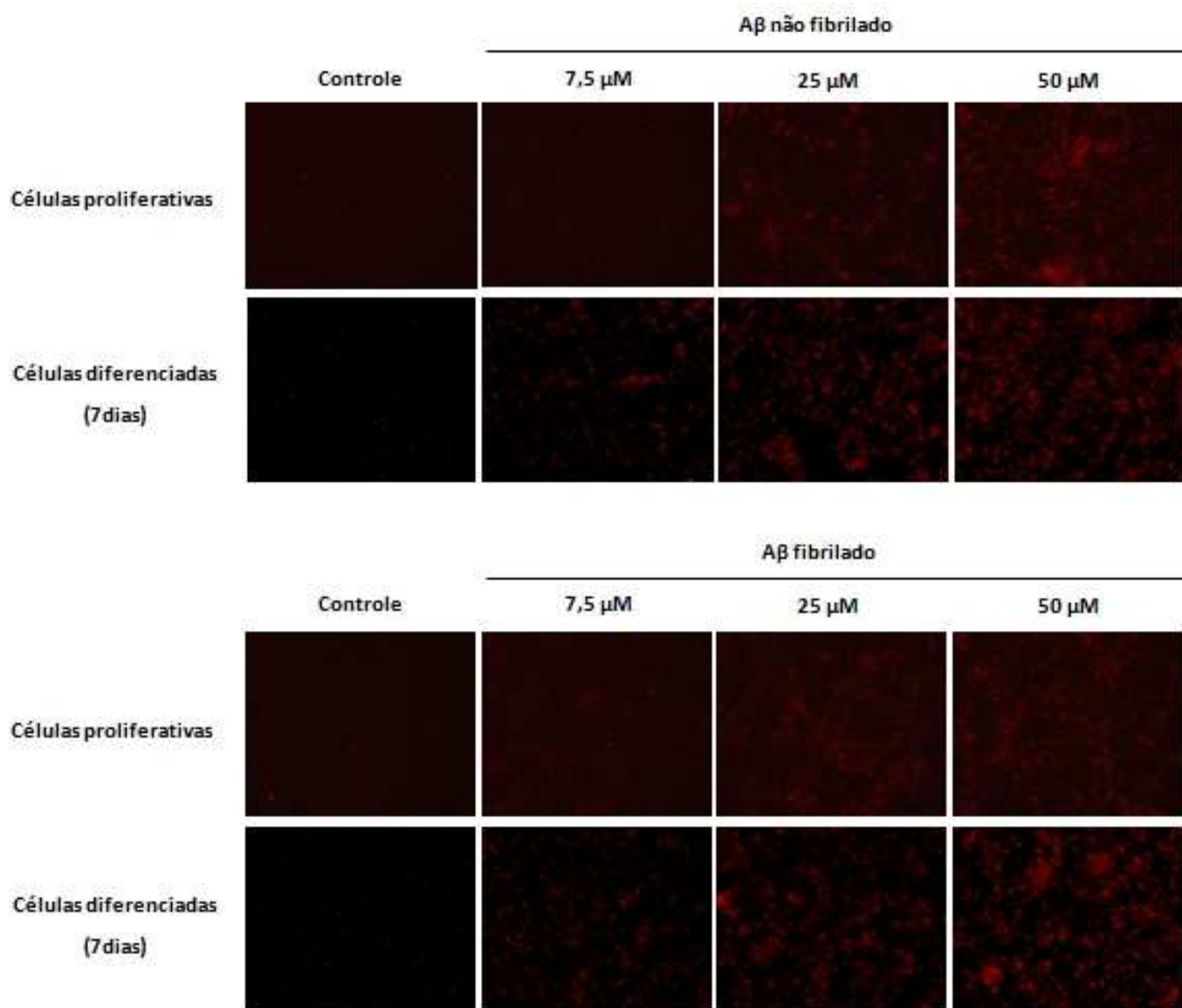


Figura 6

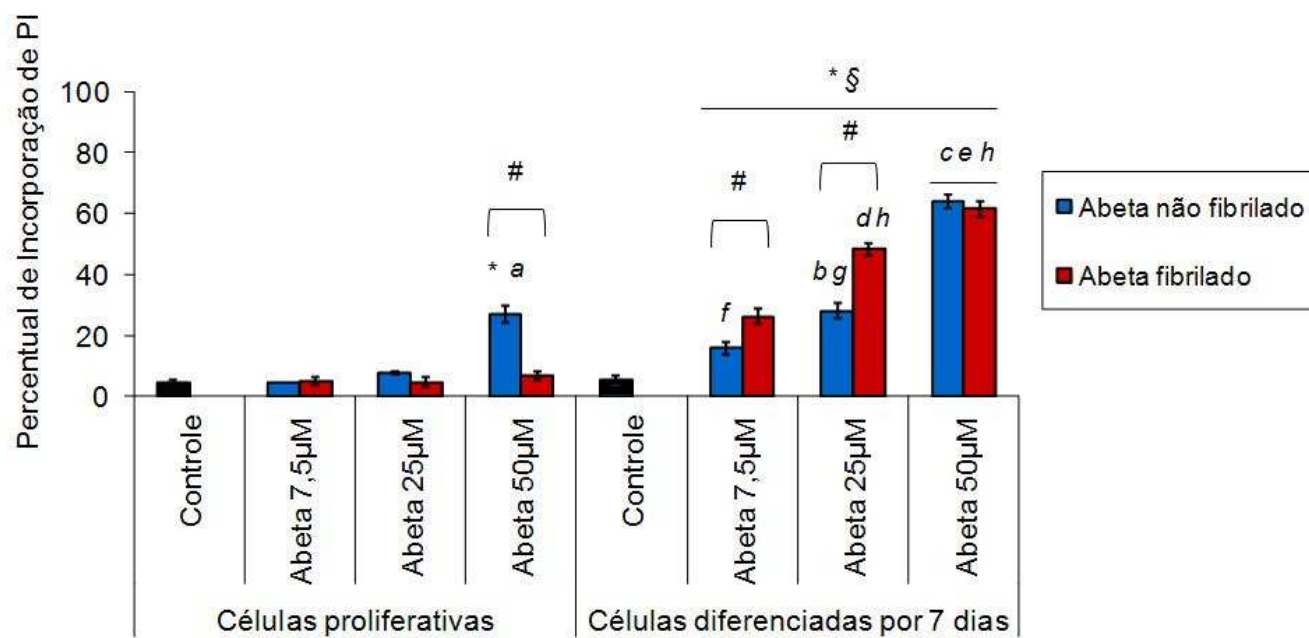


Figura 7

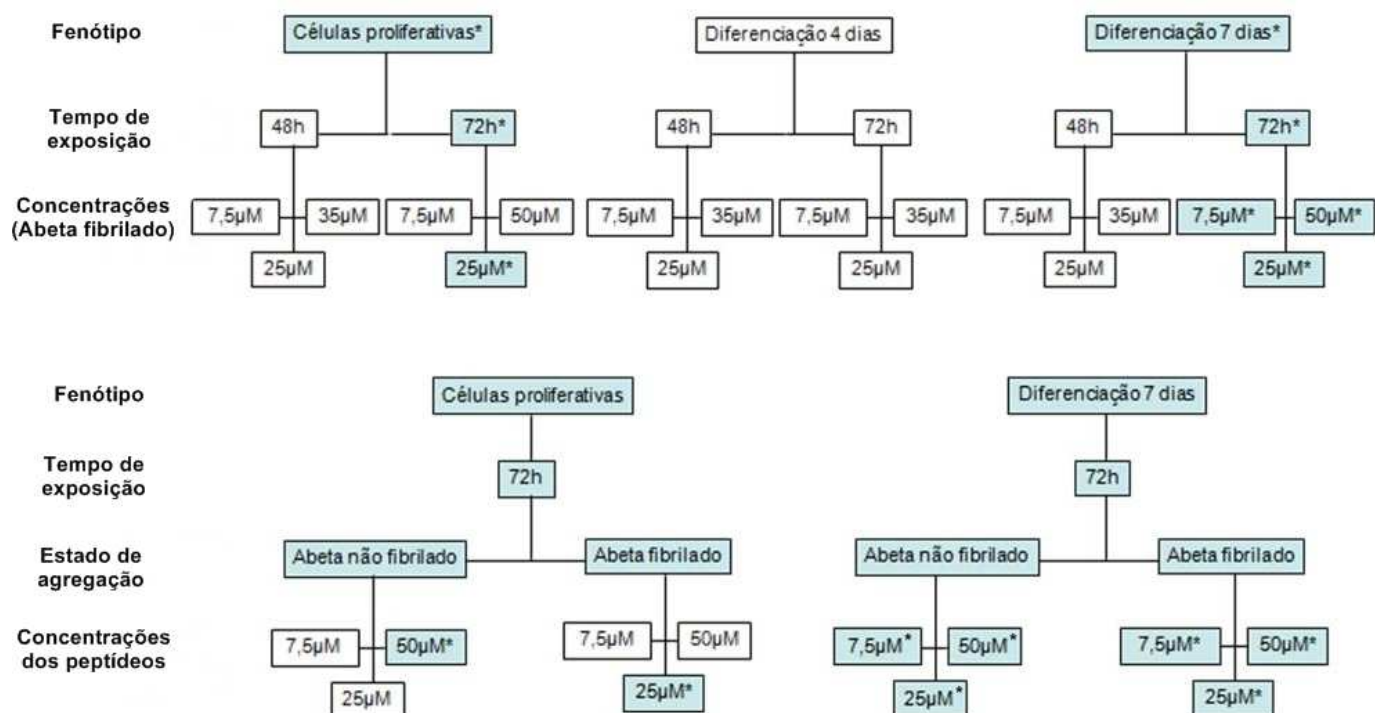


Figura 8

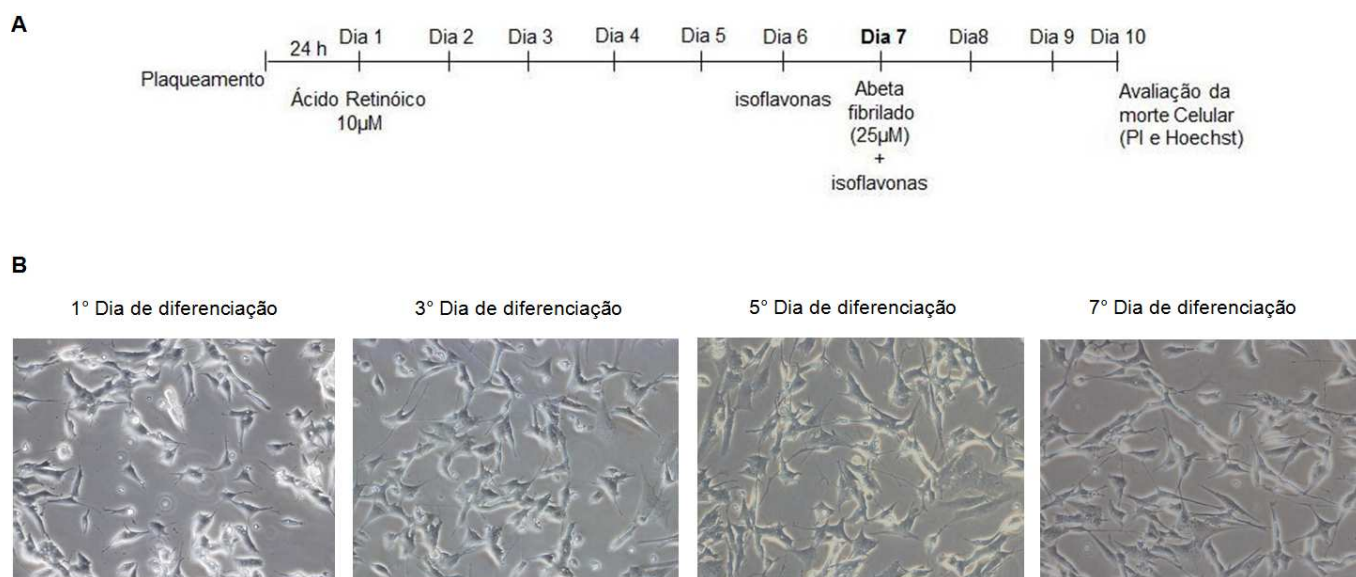


Figura 9

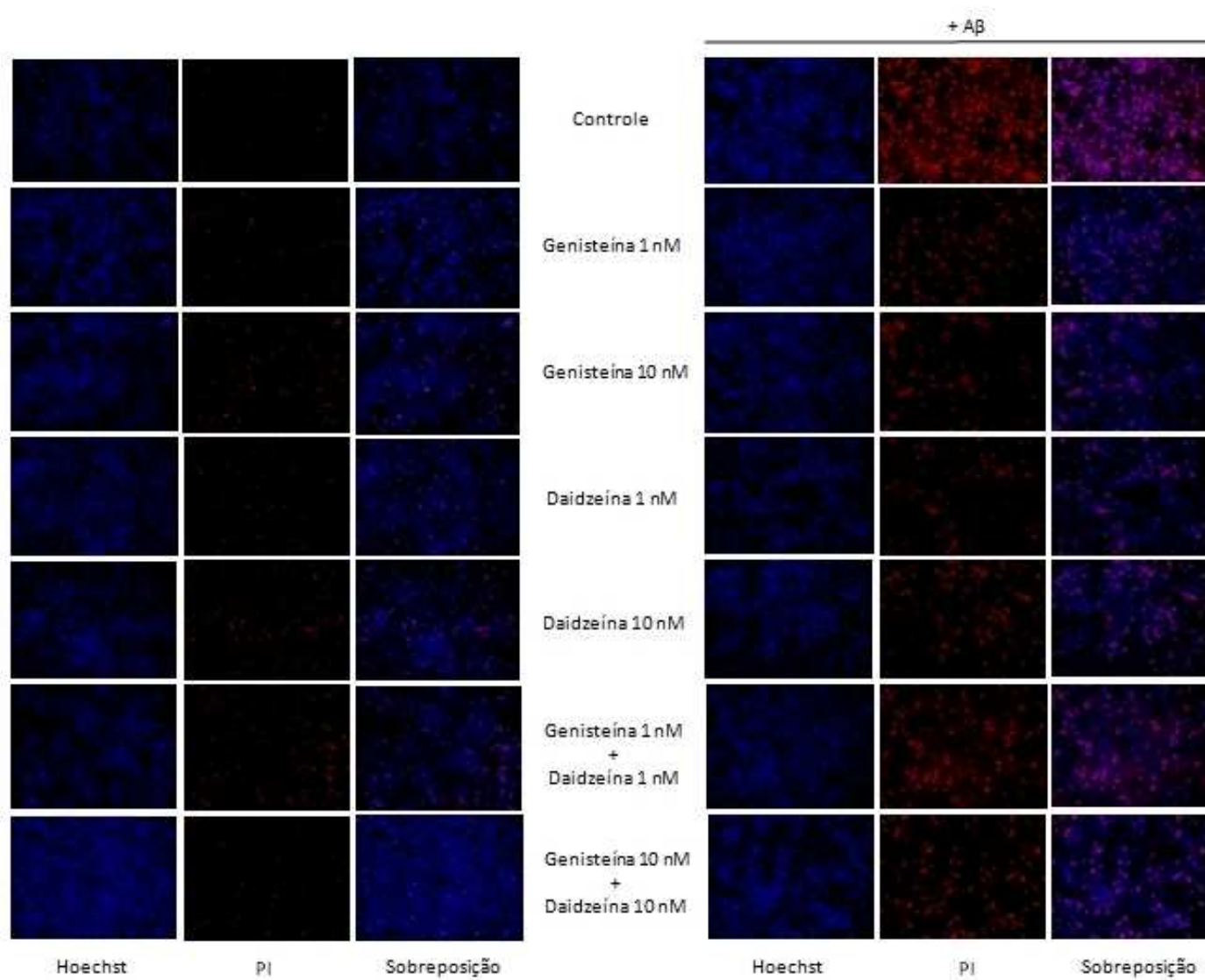
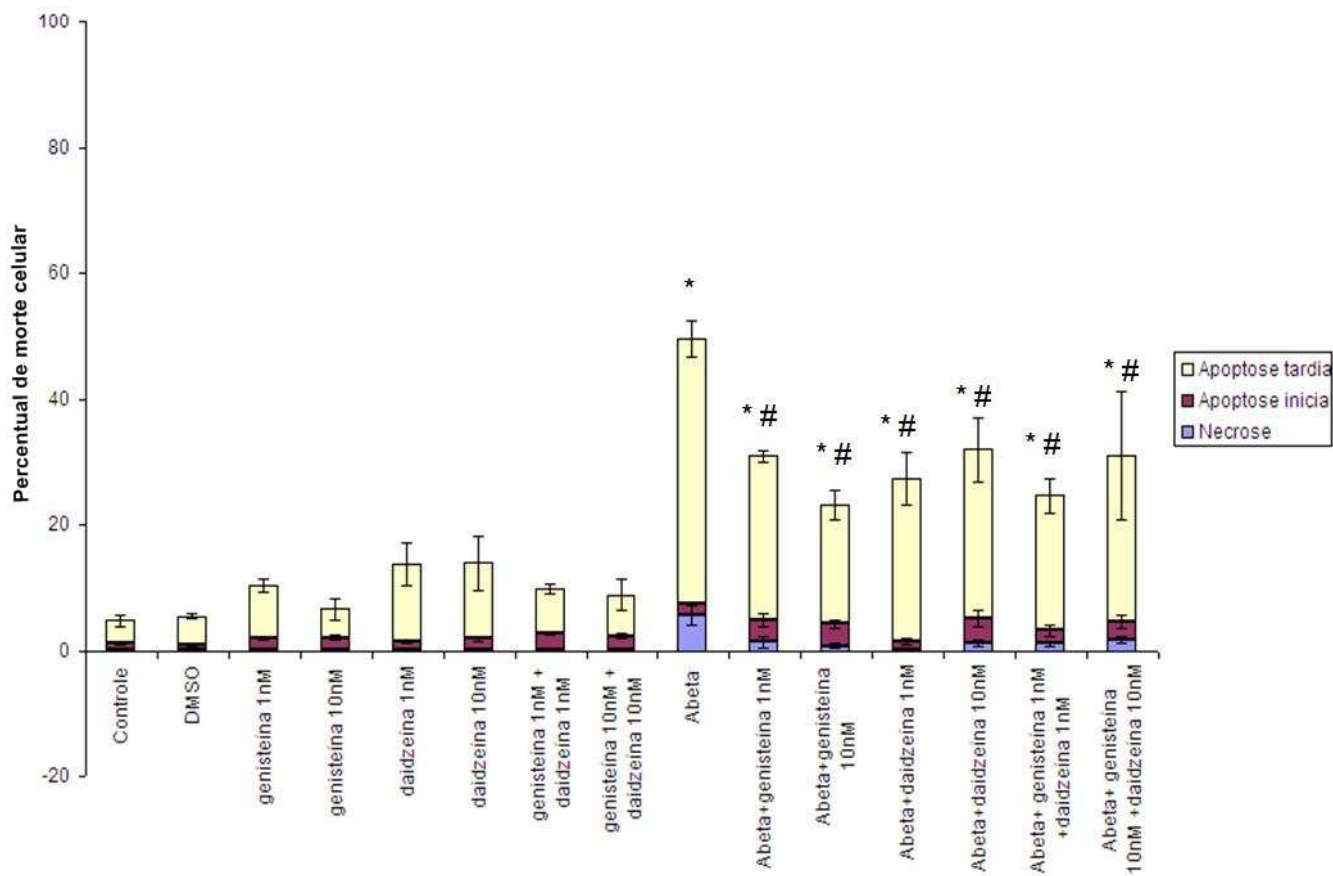


Figura 10



## TABELAS

**Tabela 1. Efeitos do A $\beta$  e das isoflavonas sobre diferentes tipos de morte celular.**

	<b>Necrose</b>	<b>Apoptose inicial</b>	<b>Apoptose tardia</b>
<b>Controle</b>	0,17 $\pm$ 0,061	0,88 $\pm$ 0,204	3,74 $\pm$ 0,907
<b>DMSO</b>	0,20 $\pm$ 0,120	0,65 $\pm$ 0,081	4,52 $\pm$ 0,388
<b>Genisteína 1nM</b>	0,13 $\pm$ 0,046	1,79 $\pm$ 0,267	8,43 $\pm$ 1,068
<b>Genisteína 10nM</b>	0,18 $\pm$ 0,156	1,90 $\pm$ 0,308	4,46 $\pm$ 1,645
<b>Daidzeína 1nM</b>	0,10 $\pm$ 0,095	1,38 $\pm$ 0,308	12,24 $\pm$ 3,352
<b>Daidzeína 10nM</b>	0,06 $\pm$ 0,056	1,78 $\pm$ 0,453	12,07 $\pm$ 4,324
<b>Genisteína 1nM + daidzeína 1nM</b>	0,05 $\pm$ 0,030	2,67 $\pm$ 0,227	7,07 $\pm$ 0,846
<b>Genisteína 10nM + daidzeína 10nM</b>	0,09 $\pm$ 0,041	2,22 $\pm$ 0,394	6,54 $\pm$ 2,43
<b>Abeta</b>	5,59 $\pm$ 1,642 *	1,79 $\pm$ 0,256	42,25 $\pm$ 2,878 *
<b>Abeta+genisteína 1nM</b>	1,37 $\pm$ 0,848 #	3,52 $\pm$ 0,984 *	25,99 $\pm$ 0,993 *#
<b>Abeta+genisteína 10nM</b>	0,78 $\pm$ 0,295 #	3,50 $\pm$ 0,679 *	18,84 $\pm$ 2,360 *#
<b>Abeta+daidzeína 1nM</b>	0,05 $\pm$ 0,046 #	1,32 $\pm$ 0,530	25,96 $\pm$ 4,097 *#
<b>Abeta+daidzeína 10nM</b>	1,18 $\pm$ 0,450 #	3,96 $\pm$ 1,244 *	26,86 $\pm$ 5,070 *#
<b>Abeta+ genisteína 1nM +daidzeína 1nM</b>	1,09 $\pm$ 0,353 #	2,06 $\pm$ 0,882	21,46 $\pm$ 2,830 *#
<b>Abeta+ genisteína 10nM +daidzeína 10nM</b>	1,66 $\pm$ 0,458 #	2,99 $\pm$ 1,020 *	26,30 $\pm$ 10,140 *#

\* = significativamente diferente do controle

# = significativamente diferente do grupo Abeta p<0,05

Dados expressos como média do percentual de morte  $\pm$  erro padrão, n=4, experimento em duplicata

#### 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho padronizou um modelo *in vitro* para o estudo da toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub>, utilizando a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os parâmetros avaliados para padronização do modelo incluíram fenótipo celular (células proliferativas ou diferenciadas com ácido retinóico), tempo de exposição ao peptídeo (48 ou 72h), estado de agregação do A $\beta$ <sub>25-35</sub> (fibrilado ou não fibrilado), e concentração do mesmo.

Nossos resultados permitiram demonstrar que as células SH-SY5Y diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico (10  $\mu$ M) são mais vulneráveis ao efeito tóxico do peptídeo A $\beta$ , quando comparadas a células proliferativas ou diferenciadas por 4 dias. Levando em consideração os parâmetros avaliados no modelo, as condições experimentais padronizadas como ideais para a reprodução do modelo de toxicidade do peptídeo A $\beta$  foram:

- fenótipo: células diferenciadas com ácido retinóico (10  $\mu$ M) por 7 dias
- tempo de exposição ao peptídeo A $\beta$ : 72h
- estado de agregação: peptídeo A $\beta$  na forma fibrilada
- concentração: 25  $\mu$ M

Por utilizar uma linhagem neuronal humana, e por ter sido padronizada em placas de 96 poços, com uso de pequenos volumes de meio de cultura e de A $\beta$ , o presente modelo constitui-se em valiosa ferramenta para o *screening* de drogas neuroprotetoras frente à doença de Alzheimer.

Uma vez padronizado o modelo, avaliou-se o possível efeito neuroprotetor de isoflavonas da soja, genisteína e daidzeína, isoladas ou associadas, e nas concentrações de 1 ou 10 nM. Observou-se que ambas isoflavonas, quer associadas ou isoladas, e em ambas as concentrações testadas, foram capazes de prevenir parcialmente a apoptose, e de prevenir completamente a necrose desencadeadas pelo peptídeo A $\beta$ . Estes dados sugerem um importante efeito neuroprotetor destas drogas, necessitando, porém, de mais estudos para melhor avaliar sua validade e eficácia na terapia da doença de Alzheimer.



## 5. PERSPECTIVAS

Considerando a ação neuroprotetora exibida pelas isoflavonas da soja frente à toxicidade do peptídeo  $A\beta_{25-35}$ , faz-se necessário, ainda, investigar os mecanismos moleculares envolvidos na neuroproteção observada.

Dentre as vias de morte celular a serem investigadas no presente modelo, destaca-se a da GSK3 $\beta$ , por desempenhar um papel importante na DA, ao desencadear processo de neuroinflamação e apoptose, e por estar envolvida na hiperfosforilação da proteína Tau. Trabalhos tem sugerido que o peptídeo  $A\beta_{25-35}$  seria capaz de reduzir a fosforilação da GSK3 $\beta$ , aumentando assim sua atividade (Kreutz et al., 2011).

Dados não publicados do grupo demonstraram a ação das isoflavonas genisteína e daidzeína, na modulação da expressão de gangliosídios de membrana, em especial do gangliosídeo GM1. Considerando que este gangliosídeo exerce funções neurotróficas, sendo capaz de promover neuroproteção frente ao peptídeo  $A\beta$ , possivelmente através de modulação da via da GSK3 $\beta$  (Kreutz et al., 2011), pretende-se investigar se o efeito neuroprotetor das isoflavonas, e sua possível atuação sobre a via da GSK3 $\beta$ , poderiam ser mediadas por alterações no conteúdo ou distribuição dos gangliosídios de membrana.

## 6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

AlzheimerMed [www.alzheimermed.com.br](http://www.alzheimermed.com.br) (acessado em 15/11/2012).

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI: Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995, 168:342-357.

Barnes S, Sfakianos J, Coward L, Kirk M: Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv Exp Med Biol* 1996, 401:87-100.

Belcher SM, Zsarnovszky A: Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 299:408-414.

Blurton-Jones M, Laferla F M: Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res* 2006, 5: 437-448.

Chaves ML, Camozzato AL, Godinho C, Piazenski I, Kaye J: Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2009, 122(3):181-187.

Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC: Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 2009, 30(1):127-35

Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B: Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl.* 2007, 72:17-28.

Cotran R S, Kumar V, Robbins S L: Pathologic Basis of Disease. In: Girolami, de U.; Frosch, M.P.; Anthony, D.C: 1994, The Central Nervous System. 5. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders.

Cummings JL: Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004, 351(1):56-67. Review.

Da Silva KA, Shaw JE, McLaurin, J: Amyloid- $\beta$  fibrillogenesis: Structural insight and therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2010, 223 (2): 311-321.

Denis L, Morton MS, Griffiths K: Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol* 1999, 35:377-387.

Drechsel DN, Hyman, A A, Cobb, M H, Kirschner, M W. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by microtubule-associated protein tau. *Mol Cel Biol* 1992, 10: 1141-1154.

Edsjö A, Holmquist L, Pålman S: Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin Cancer Biol* 2007, 17(3):248-256.

Golde T: Disease modifying therapy for AD? *J Neurochem* 2006, 99: 689-707.

Graeber M B, Kösel S, Grasbon-Frodl E, Möller HJ, Mehraein P: Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1998, 1(3): 223-228.

Haass C, Selkoe D J: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat Reviews/ Mol Cell Biol* 2007, 8:101-112.

Hernández F, Avila, J: Tauopathies. *Cel Mol Life Sci* 2007, 64:2219 – 2233.

Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, Comiran RA, Bernardi A, Campos MM, Battastini AM, Salbego C: Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3beta, tau and neuroinflammation. *J Pineal Res* 2010, 48(3):230-238.

Iqbal K, Alonso AC, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong C, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Iqbal I G: 2005. Tau Pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 198-210.

Liang J, Tian Y, Fu L, Wang T, Li H, Wang P, Han R, Zhang J, Skibsted LH: Daidzein as a Antioxidant of Lipid: Effects of the Microenvironment in Relation to Chemical Structure. *J Agric Food Chem* 2008, 56:10376-10383.

Luchtman D W, Song C: Why SH-SY5Y cells should be differentiated. *Neurotoxicology* 2010 31(1):164-5; author reply 165-6.

Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE: Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J Nutr Biochem* 2000. 11(1):2-13

Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P: Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006, 46, 451–480.

Montagut C, Rovira A, Albanell J: The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin and Transl Oncol* 2006, 5:313-317.

Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron A: Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* 2009, 30(2):239-258.

Pimplikar SW: Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem cell B* 2009, 41:1261–1268.

Rapoport M, Ferreira A: PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J Neurochem* 2000, 74:125-133.

Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM: Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 2000, 80(3):1021-54. Review

Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM: A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Sci World J* 2012, 2012:756357. Review

Sarkanen JR, Nykky J, Siikanen J, Selinummi J, Ylikomi T, Jalonen TO: Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2007, 102(6):1941-52.

Schüle B, Pera RA, Langston JW: Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? *Biochim Biophys Acta* 2009, 1792(11):1043-1051.

Suh Y, Checler F: Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and Alpha-Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease (Review). *Pharmacol Rev* 2000, 54:469-525.

WHO – World Health Organization. 2012. Disponível: [www.who.int](http://www.who.int) em 15/04/2012.

Yousef M I, Kamel KI, Esmail AM, Baghdadi HH: Antioxidant actives and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits. *Food Chem Toxicol* 2004, 42:1497-1503.

Zhang C: Natural compounds that modulate BACE1-processing of amyloid-beta precursor protein in Alzheimer's disease. *Discov Med* 2012, 14:189-97.

Zhao L, Chen Q, Brinton RD: Neuroprotective and Neurotrophic Efficacy of Phytoestrogens in Cultured Hippocampal Neurons. *Exp Bio Med* 2002, 227:509-519.

Zinser E G, Hartmann T, Grimm M O W: Amyloid beta-protein and lipid metabolism (Review). *Biochim Biophys Acta* 2007, 1768(8): 1991-2001.