

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

O papel do aminoácido Leucina na modulação da atividade do  
peptídeo beta amiloide em células SH-SY5Y

FÁBIO MEDICI LORENZETI

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

O papel do aminoácido Leucina na modulação da atividade do  
peptídeo beta amiloide em células SH-SY5Y

FÁBIO MEDICI LORENZETI

São Paulo

2014

FÁBIO MEDICI LORENZETI

O papel do aminoácido Leucina na modulação da atividade do  
peptídeo beta amiloide em células SH-SY5Y

Dissertação apresentada a  
Escola de Educação Física e  
Esportes da Universidade de  
São Paulo, como requisito  
parcial para obtenção do título  
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:  
Biodinâmica do Movimento  
Humano

Orientador: Prof. Dr. Antonio  
Herbert Lancha Jr.

São Paulo

2014

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Lorenzetti, Fábio Medici

Título: O papel do aminoácido Leucina na modulação da atividade do peptídeo beta amiloide em células SH-SY5Y.

Dissertação apresentada a Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*Este trabalho é dedicado ao meu pai Antonio Carlos Lorenzetti e minha mãe Maria Elena Medici Lorenzetti, por acima de tudo acreditarem em mim, e as minhas avós Ester Maria Marson Medici e Cervina Alves Pereira pelas orações.*

## Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Antonio Herbert Lancha Jr pela imensa oportunidade de fazer parte do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) e, me guiar na minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. Cristoforo Scavone, livre-docente do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) por abrir as portas do seu laboratório e me propiciar condições de refletir a cerca de inúmeros temas relacionados à neurofarmacologia, neurobiologia, doenças neurodegenerativas e hormese.

A Lidia Mitiko Yshii membro pesquisadora do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular pela importante colaboração com o projeto e pela paciência em esclarecer minhas duvidas.

A técnica responsável pelo citômetro de fluxo Andrea Glatt, por me auxiliar durante as análises e pela paciência em esclarecer minhas duvidas.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro, tornando possível a realização da minha pesquisa.

“Um dia é preciso parar de sonhar e, de algum modo, partir”.

Amyr Klink

## RESUMO

LORENZETI, F. M. O papel do aminoácido Leucina na modulação da atividade do peptídeo beta amiloide em células SH-SY5Y. 2014. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esportes, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Estudos demonstram que a indução do estresse oxidativo pelo peptídeo beta amiloide ( $A\beta$ ) exerce um importante papel no desencadeamento da excitotoxicidade neuronal o que pode resultar no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A formação do peptídeo  $A\beta$  se deve a alterações na proteína precursora de amiloide (APP) que é clivada para a formação do peptídeo  $A\beta$ . Por sua vez, os mecanismos de ação do  $A\beta$  no S.N.C. ocorrem através da sinalização do receptor NMDA (N-metil D-aspartato) receptor este que quando ativado pelo glutamato exerce importante papel fisiológico no S.N.C., visto que apresenta atividade ionotrópica que permite o influxo de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  para as células neuronais, auxiliando nos processos de formação da memória e aprendizagem. Entretanto, apesar do seu papel fisiológico, a ativação excessiva do receptor NMDA é fortemente correlacionada com lesões no S.N.C. decorrente da excessiva permeabilidade do íon  $Ca^{2+}$  para o citosol das células neuronais. Com isso as concentrações de glutamato na fenda sináptica são estritamente controladas para que não haja ativação excessiva dos receptores com atividade glutamatérgica, como o receptor NMDA. Estudos indicam que o transporte de glutamina/glutamato através da barreira hematoencefálica é menor do que de outros aminoácidos, sendo que cerca de 25% a 30% do transporte de aminoácidos dos vasos sanguíneos para o cérebro através da barreira hematoencefálica é ocupado pelo aminoácido leucina, sendo este um grande responsável pela síntese de glutamato/glutamina no S.N.C. Com isso, estudos tem demonstrado que dietas enriquecidas com aminoácidos de cadeia ramificada, dentre eles a leucina, é responsável por alterar o metabolismo do glutamato e aumentar a susceptibilidade à excitotoxicidade de células neurais. A fim de testar esta hipótese utilizamos um modelo de cultura de células de neuroblastoma humano e realizamos o tratamento com diferentes concentrações de aminoácido leucina associado com o tratamento de peptídeo beta-amilóide. Realizamos as análises de citotoxicidade (LDH), viabilidade celular (MTT) e apoptose celular por citometria de fluxo (marcação com PE Anexina V e 7-AAD). Nossos resultados indicam que houve diferenças apenas entre o controle em relação aos demais grupos de tratamento.

Palavras-chave: Aminoácido leucina; peptídeo beta-amilóide; células SH-SY5Y; apoptose celular.



## ABSTRACT

LORENZETI, F. M. The role of leucine in the modulation of beta amyloid peptide activity in SH-SY5Y cells. 2014. 42 f. Qualificação Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esportes, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Studies demonstrate that induction of oxidative stress by beta amyloid peptide (A $\beta$ ) plays an important role in triggering neuronal excitotoxicity which can result in the development of neurodegenerative diseases. The formation of A $\beta$  peptide are due to changes in the amyloid precursor protein (APP) which is cleaved to form the peptide A $\beta$ . On the other hand, the mechanisms of action of A $\beta$  in the C.N.S. occur through signaling of the NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor that when activated by glutamate plays an important physiological role in the C.N.S., as has inotropic activity that allows the influx of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> into the neuronal cells, assisting in procedures of memory formation and learning. However, despite its physiological role, the excessive activation of the NMDA receptor is strongly correlated with C.N.S. lesions due to excess permeability of Ca<sup>2+</sup> ions into the cytosol of neuronal cells. Thus the concentrations of glutamate in the synaptic cleft are strictly controlled so that there is excessive activation of receptors with glutamatergic activity, as the NMDA receptor. Studies indicate that the transport of glutamine/glutamate across the blood brain barrier is lower than that of other amino acids, of which about 25% to 30% of the amino acid transport blood vessels to the brain through the blood brain barrier is occupied by leucine this being one largely responsible for the synthesis of glutamate/glutamine in the C.N.S. Thus, studies have shown that diets enriched in branched chain amino acids, including leucine, are responsible for altering the metabolism of glutamate and excitotoxic increase susceptibility to neural cells. To test this hypothesis we used a cell culture model of human neuroblastoma and carry out the treatment with different concentrations of leucine associated with the processing of amyloid-beta peptide. We performed analysis of cytotoxicity (LDH), cell viability (MTT assay) and apoptosis using flow cytometry (Annexin V staining with PE and 7-AAD). Our results indicate that there were differences only between the control compared to the other treatment groups.

**KEYWORDS:** Leucine; beta-amyloid peptide; SH-SY5Y cells; cellular apoptosis.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	OBJETIVOS.....	08
1.1.1	Objetivo geral.....	08
1.1.2	Objetivos específicos.....	08
1.2	METODOLOGIA.....	08
1.2.1	Preparação do peptídeo beta-amilóide 1-42 (A $\beta$ 1-42).....	08
1.2.2	Cultura de células.....	09
1.2.3	Determinação da citotoxicidade celular.....	10
1.2.4	Determinação da viabilidade celular.....	10
1.2.5	Citometria de fluxo para detecção de células apoptóticas.....	11
1.2.6	Análise estatística.....	12
2	RESULTADOS.....	13
3	DISCUSSÃO.....	18
4	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	26

## 1 INTRODUÇÃO

Há mais de duas décadas pesquisas sobre o peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ) mostram uma série de evidências que a sua acumulação no sistema nervoso central (S.N.C.) altera a memória e a cognição, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SELKOE, 1991; HARDY; HIGGINS, 1992; MANDELKOW; MANDELKOW, 2011).

Alterações estas decorrentes da ativação de diversos mediadores como: lipídios de membrana, receptores proteicos, proteínas de canal, mediadores inflamatórios, etc. Desencadeando a neurotoxicidade (SELKOE, 1991; HARDY; HIGGINS, 1992).

Com o aumento da neurotoxicidade há, também, um possível risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sendo estas consideradas um dos grandes problemas de saúde pública, visto que promove alterações fisiopatológicas significativas, tais como: a perda da memória, sendo esta grave o suficiente para interferir com a vida social (GÖTZ et al., 2011).

A formação do peptídeo A $\beta$  se deve a alterações na proteína precursora de amiloide (APP) que é clivada para a formação do peptídeo A $\beta$ , assim como alterações nos genes que codificam presenilina1 e 2 (PSEN1 e PSEN2) e que são responsáveis pela formação do peptídeo A $\beta$  (GÖTZ et al. 2011).

Durante a formação do peptídeo A $\beta$  uma enzima  $\beta$ -secretase reconhece o último aminoácido da cadeia peptídica beta-amilóide, enquanto que uma enzima  $\gamma$ -secretase de clivagem na região carboxi-terminal dita o comprimento. A atividade da enzima  $\beta$ -secretase tem sido atribuída por protease aspártica transmembrana - BACE 1 (VASSAR et al., 1999), enquanto que a atividade da enzima  $\gamma$ -secretase depende de quatro componentes essenciais, presenilina, nicastrina, APH-1 e PEN-2 que juntos formam um complexo proteolítico (EDBAUER et al. 2003).

Não obstante, a atividade da enzima  $\alpha$ -secretase está envolvida na via não-amiloidogênica, impedindo a formação do peptídeo beta-amilóide (GÖTZ; ITTNER, 2008).

Sendo identificadas mutações autossômicas dominantes em três genes: o gene APP, e nos genes PSEN1 e PSEN2. Além destes o gene da

apolipoproteína E (Apo E) foi identificado como um fator de risco para a formação do peptídeo beta-amilóide (BERTRAM; TANZI, 2008).

Os mecanismos de ação do A $\beta$  no S.N.C. ocorrem através da sinalização do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), em que a proteína Tau, que é resultado do *splicing* alternativo de um único gene designado microtúbulos associados à proteína Tau (MAPT), é reconhecida como uma proteína axonal se associando com a proteína Fyn, uma proteína da tirosina cinase da família oncogene, que fosforila a subunidade NR2B do receptor NMDA, mediando à formação do complexo protéico pós-sináptico de densidade 95 (PSD95) ao receptor NMDA, isso resulta na formação excessiva de óxido nítrico (NO) e aumento da permeabilidade do cálcio. Esse mecanismo gera a agregação da proteína Tau, bem como a liberação mitocondrial do citocromo c (Cyt c), ativação das caspases e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) mecanismos que cursam com a neurodegeneração (GÖTZ et al. 2011, SHETTY; GALEFFI; TURNER, 2011).

O receptor NMDA exerce importante papel fisiológico no S.N.C., visto que apresenta atividade ionotrópica que permite o influxo de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> para as células neuronais, auxiliando nos processos de formação da memória e aprendizagem.

Fisiologicamente a ativação do receptor NMDA se deve pela ligação do glutamato que possui sua liberação eficientemente controlada pelos neurônios pré-sinápticos, sendo posteriormente a recaptação do glutamato da fenda sináptica realizada pelos astrócitos.

Os neurônios com atividade glutamatérgica são responsáveis por mediar processos vitais como: codificação de informações, formação e recuperação da memória, reconhecimento espacial e manutenção da consciência (MCENTEE; CROOK, 1993)

Entretanto, apesar do seu papel fisiológico, a ativação excessiva do receptor NMDA é fortemente correlacionada com lesões no S.N.C. decorrente da excessiva permeabilidade do íon Ca<sup>2+</sup> para o citosol das células neuronais (KRISTIAN; SIESJO, 1998).

A liberação do glutamato pelo neurônio pré-sináptico é desencadeada por um mecanismo Ca<sup>2+</sup> dependente, em que a presença deste íon no terminal do axônio faz com que as vesículas contendo o glutamato se fundam com a

membrana do neurônio pré-sináptico e liberem o glutamato que poderá se ligar em um receptor com atividade glutamatérgica no neurônio pós-sináptico (FILLENZ, 1995).

As concentrações pré-sinápticas de glutamato na fenda são de 2 a 5  $\mu\text{mol/L}$ , concentrações estas que passam para 50 a 100  $\mu\text{mol/L}$ , após a despolarização do neurônio pré-sináptico (DAIKHIN; YUDKOFF, 2000).

Com isso, é necessário que o glutamato presente na fenda sináptica seja rapidamente removido para que não haja citotoxicidade (KRISTIAN; SIESJO, 1998; FILLENZ, 1995; YUDKOFF, 1994; 1997; DAIKHIN; YUDKOFF, 2000), processo este que pode ocorrer de três maneiras:

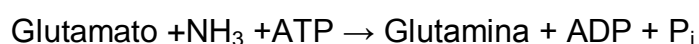
1. Captação por neurônios pós-sinápticos;
2. Captação por neurônios pré-sinápticos;
3. Captação por células não neuronais.

Quando analisado o grau de participação de cada uma das três possibilidades de remoção do glutamato da fenda sináptica, os neurônios pós-sinápticos atuam de maneira pouco eficaz, quando relacionados aos neurônios pré-sinápticos, entretanto, o mecanismo mais importante de remoção do glutamato ocorre pelos astrócitos (DANBOLT, 1994, GEGELASHVILI; SCHOUSBOE, 1998, TAKAHASHI et al. 1997).

Fato este que é evidenciado em trabalhos como o de Tanaka et al. (1997) que mostra que camundongos *knockout* para o transportador de glutamato pelos astrócitos apresentam suscetibilidade a lesão cortical, sendo vulnerais a excitotoxicidade.

O ciclo glutamato-glutamina no S.N.C. tem início com a liberação do glutamato pelos neurônios pré-sinápticos na fenda sináptica, após esta liberação o glutamato irá atuar nos neurônios pós-sinápticos que apresentem atividade glutamatérgica.

O glutamato presente na fenda sináptica é rápida e eficientemente removido pelos astrócitos através dos transportadores de glutamato. Nos astrócitos o glutamato é convertido à glutamina por ação da enzima glutamina sintetase através da reação:



Isso ocorre para que a glutamina possa ser liberada para o fluido extracelular e, posteriormente, captada pelas células neuronais, sem que gere despolarização neuronal, bem como, não haja alteração crônica da frequência sinal-ruído (MARTINEZ-HERNANDEZ et al. 1977, NOREMBERG; MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979).

Nas células neuronais a glutamina é convertida, novamente, a glutamato por ação da enzima mitocondrial glutaminase fosfato-dependente através da reação:



Com isso, o glutamato fica prontamente disponível para ser liberado para a fenda sináptica, atuando nos neurônios pós-sinápticos através da sua ligação com um de seus receptores glutamatérgicos.

O ciclo glutamato-glutamina é de vital importância para o S.N.C. visto que:

1. Garante a rápida remoção do glutamato da fenda sináptica mediada principalmente pelos astrócitos evitando a excitotoxicidade;
2. Nos astrócitos, a conversão de glutamato a glutamina, possibilita o redirecionamento da glutamina para os neurônios que poderá ser novamente convertida a glutamato;
3. Nos neurônios a glutamina é convertida a glutamato que além de atuar como um importante neurotransmissor pode ser convertido a  $\alpha$ -cetoglutarato, atuando na manutenção energética neuronal;
4. Por fim, o ciclo glutamato-glutamina atua como um importante sistema “tampão” de amônia ( $\text{NH}_3$ ) que é potencialmente neurotóxica.

Estudos de Smith et al. (1987) indicam que o transporte de glutamina/glutamato através da barreira hematoencefálica é menor do que de outros aminoácidos, sendo que mais de 50% do transporte de aminoácidos dos vasos sanguíneos para o cérebro através da barreira hematoencefálica é ocupado pelos aminoácidos fenilalanina e leucina, e apenas 5% do transporte de aminoácidos corresponde a glutamina.

Sendo assim, a síntese de glutamato no S.N.C. necessita de um doador de grupo amino que seja rápida e eficientemente transportado através da barreira hematoencefálica e, além disso, que seja facilmente transaminado.

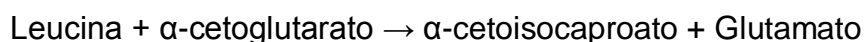
O tecido cerebral é reconhecidamente um grande sítio de ação das aminotransferases de aminoácidos de cadeia ramificada, enzimas estas que possuem isoformas tanto citosólica, quanto mitocondrial (BIXEL; HUTSON; HAMPRECHT, 1997, HUTSON; WALLIN; HALL, 1992).

Os astrócitos, por sua vez, são os responsáveis pelo metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, sigla em inglês) e dos cetoácidos (AUESTAD et al., 1991; BIXEL; HAMPRECHT, 1994; HAMPRECHT et al., 1995).

Neste sentido, estudos mostram que os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, sigla em inglês), em especial, a leucina, exerce este importante papel (YUDKOFF, 1994; 1997, DAIKHIN; YUDKOFF, 2000).

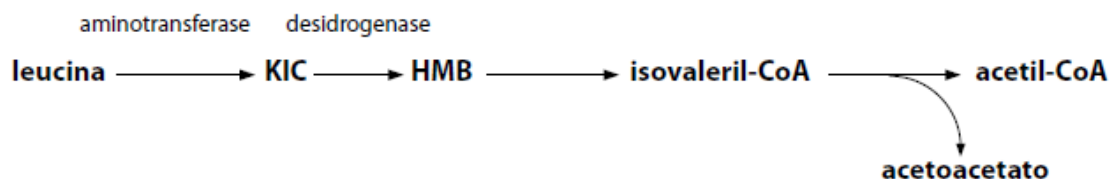
Estudos realizados por Yudkoff et al. (1994) com cultura de astrócitos, avaliam o tratamento com [<sup>15</sup>N]leucina, [<sup>15</sup>N]isoleucina e [<sup>15</sup>N]valina e a posterior realização de análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para a mensuração da incorporação de <sup>15</sup>N pelo glutamato e glutamina, mostra que de 25% a 30% do nitrogênio necessário para a síntese de glutamato/glutamina é derivado da apenas da leucina.

Com isso o aminoácido leucina atravessa a barreira hematoencefálica através do transportador de aminoácidos, sendo primariamente direcionado para os astrócitos aonde será metabolizado por uma aminotransferase de cadeia ramificada através da reação:



O glutamato formado por sua vez dará início ao ciclo glutamato-glutamina, enquanto que o cetoácido  $\alpha$ -cetoisocaproato poderá passar por sucessivas reações enzimáticas podendo formar como produtos finais acetil-CoA (intermediário do ciclo de *Krebs*) e acetoacetato (corpos cetônicos) (figura1) (MARTINEZ-HERNANDEZ et al. 1977, NORENBURG; MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979, YUDKOFF et al., 1994; 1997, DAIKHIN; YUDKOFF, 2000,

BIXEL; HUTSON; HAMPRECHT, 1997, HUTSON; WALLIN; HALL, 1992, ZANUTO et al., 2011)

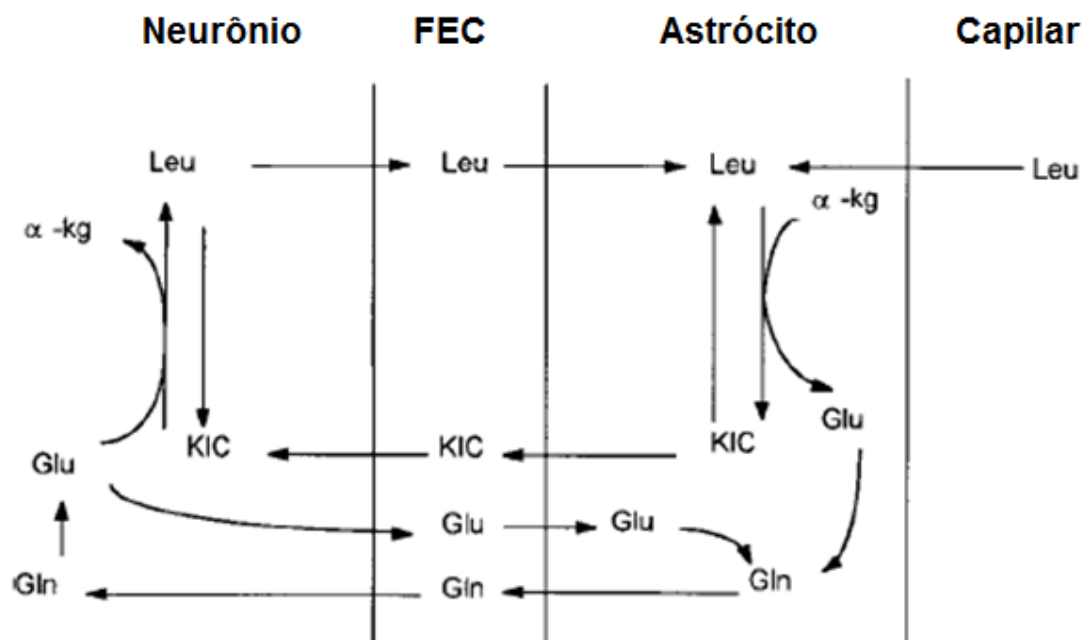


**Figura 1** – Formação de acetoacetato e acetil-CoA a partir da leucina. KIC =  $\alpha$ -cetoisocaproato; HMB =  $\beta$ -hidroxy- $\beta$ -metilbutirato. (Zanuto et al., 2011).

O glutamato nas células neuronais pode sofrer transaminação e ser novamente convertido ao aminoácido leucina através da reação:



A leucina, por sua vez, é liberada para o fluído extracelular e posteriormente captada pelos astrócitos para ser metabolizada, este ciclo é denominado ciclo leucina-glutamato-glutamina (figura 2) (YUDKOFF et al., 1994, YUDKOFF, 1997, DAIKHIN; YUDKOFF, 2000).



**Figura 2** – Ciclo leucina-glutamato-glutamina. FEC = fluído extracelular; Leu = Leucina;  $\alpha$ -kg =  $\alpha$ -cetoglutarato; KIC =  $\alpha$ -cetoisocaproato; Glu = glutamato; Gln = glutamina. (Adaptado de YUDKOFF, 1997).



Paralelamente a estes dados, estudo realizado por Piscopo et al. (2011), mostra que em modelo animal, quando submetidos a uma dieta crônica enriquecida com aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs – sigla em inglês) estes apresentavam maior susceptibilidade ao estresse oxidativo no S.N.C. Assim como, demonstraram nesta investigação que uma dieta enriquecida com BCAA modula a expressão de alguns genes-chave que regulam diferentes vias de estresse oxidativo.

Em estudo realizado por Vancore (2003) hipotetiza-se que a incidência de esclerose lateral amiotrófica (ALS, sigla em inglês) entre jogadores de futebol italianos pode estar relacionada ao consumo dietético excessivo de BCAAs.

Construscieri et al. (2010) mostraram que a alta ingestão de BCAAs amplamente utilizado entre atletas, pode alterar o metabolismo do glutamato e aumentar a susceptibilidade à excitotoxicidade de células neurais.

Segundo ainda Construscieri et al. (2010) a relação entre a concentração sanguínea de BCAA e a toxicidade neural pelo aumento da via do glutamato está no intervalo de mM. Estudo este que analisou o tratamento com 2.5mM de valina, 2,5mM de isoleucina e 2,5mM de leucina em cultura de células primária do hipocampo e do córtex de ratos Wistar.

Como já apresentado na literatura dentre os BCAAs o aminoácido leucina recebe maior destaque por apresentar maior facilidade no transporte através da barreira hematoencefálica, sendo rapidamente transaminado pelos astrócitos e contribuindo significativamente para a formação do ciclo glutamato-glutamina

Com isso, consideramos a hipótese que ao isolarmos um modelo de cultura de células de neuroblastoma humano e realizarmos o tratamento com diferentes concentrações de aminoácido leucina associado com o tratamento de peptídeo beta-amilóide possa diminuir a viabilidade celular, e aumentar a apoptose desta população de células.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Verificar o efeito do aminoácido leucina em cultura de células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) em presença do peptídeo beta-amilóide na citotoxicidade celular

### 1.1.2 Objetivos específicos

1. Determinar a citotoxicidade em modelo de cultura de células SH-SY5Y após tratamento com leucina através do ensaio colorimétrico quantitativo de lactato desidrogenase (LDH);
2. Determinar a viabilidade celular em modelo de cultura de células SH-SY5Y após tratamento com peptídeo beta-amilóide e/ou leucina através do teste de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT);
3. Determinar a morte celular (apoptose) induzida pelo peptídeo beta-amilóide em modelo de cultura de células SH-SY5Y em condições controle e na presença de leucina, através da marcação de PE Anexina V com 7-Amino-Actinomycina (7-AAD).

## 1.2 METODOLOGIA

### 1.2.1 Preparação do peptídeo beta-amilóide 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ )

O peptídeo liofilizado beta-amilóide fração 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ , Sigma-Aldrich, Cat. No. A1075) foi, primariamente, diluído em água destilada em concentração de 230  $\mu$ M (solução mãe) e armazenado em  $-20^{\circ}$  C. Antes do uso, o peptídeo (solução mãe) foi diluído em PBS 1x (Gibco® contendo:  $KH_2PO_4$  1,059mM; NaCl 155,172mM;  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  2,966mM) em concentração de 10  $\mu$ M e incubado a  $37^{\circ}$  C por 5 dias para induzir agregação peptídica (MULIK et al., 2010; KAWAMOTO et al., 2008). As células foram incubadas com  $A\beta_{1-40}$  em

concentração de 1  $\mu\text{M}$  durante 12h. Concentração e tempo estes que segundo estudo realizado por Kawamoto et al. (2008) mostraram maior capacidade de indução de NF- $\kappa\text{B}$ .

### 1.2.2 Cultura de células

Foram estudadas células SH-SY5Y triplo clone da linhagem de células SK-N-SH (SK-N-SH  $\rightarrow$  SH-SY  $\rightarrow$  SH-SY5  $\rightarrow$  SH-SY5Y) de neuroblastoma que foi estabelecido em 1970 a partir de tumor ósseo metastático (BIEDLER et al., 1973; JOSHI et al., 2006).

As células foram adquiridas em colaboração com o Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do departamento de farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e que são originárias da *American Type Culture Collection* (ATCC, *Product Information Sheet* CRL-2266™).

O meio de cultura foi filtrado com membranas de ésteres de celulose com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Sarstedt).

As células foram cultivadas em meio contendo 8 mM HEPES (Promega), 44 mM Bicarbonato de sódio (Synth), meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco® contendo: glicina 0,4mM; L-arginina hidróclorido 0,398mM; L-cisteína 2HCL 0,201mM; L-glutamina 4mM; L-histidina hidróclorido-H<sub>2</sub>O 0,2mM; L-isoleucina 0,802mM; L-leucina 0,802mM; L-lisina hidróclorido 0,798mM; L-metionina 0,201 mM; L-fenilalanina 0,4mM; L-serina 0,4mM; L-treonina 0,798mM; L-triptofano 0,0784mM; L-tirosina sal dissódico desidratado 0,398mM; L-valina 0,803mM; cloreto de colina 0,0286mM; pantotenato D-cálcio 0,00839 mM; ácido fólico 0,00907mM; niacinamida 0,0328mM; piridoxina hidróclorido 0,0194mM; riboflavina 0,00106mM; tiamina hidróclorido 0,0119mM; i-inositol 0,04mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8mM; Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O 0,000248mM; MgSO<sub>4</sub> 0,814mM; KCl 5,33mM; NaCl 110,34mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 0,906mM; D-glicose 5,56mM; piruvato de sódio 1mM), com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina G-estreptomicina (Gibco®) à 37° C em meio umidificado, com de 5% de CO<sub>2</sub> (MULIK et al., 2010).

Para induzir a lesão celular, as células foram incubadas com 1  $\mu\text{M}$  de A $\beta$ <sub>1-40</sub> por 12 horas. Para estudar o efeito da leucina, as células foram pré-

incubadas com diferentes concentrações de leucina (2,5mM; 5,0mM; 7,5mM e 10,0mM) por 1,5 horas e depois o A $\beta$ <sub>1-40</sub> foi adicionado ao meio por 12 horas (KAWAMOTO et al., 2008; CONTRUSCIERE et al., 2009).

Todas as análises foram repetidas pelo menos três vezes utilizando as células com 90% de confluência para assegurar a reprodutibilidade (CAMILLERI et al., 2013).

### 1.2.3 Determinação da citotoxicidade

A citotoxicidade foi determinada através da medição da liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura (DECKER; LOHMANN-MATTHES, 1988). Após o tratamento das células, a liberação de LDH no meio foi medida utilizando o kit de ensaio colorimétrico *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega) seguindo as orientações do fabricante.

A leitura do teste foi realizada no leitor de microplaca *Biochrom Asys UVM340 (Biochrom)*, em um comprimento de onda de 490 nm. Cada teste foi realizado em triplicata e os resultados apresentados como valores de absorbância (media  $\pm$  desvio padrão).

### 1.2.4 Determinação da viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular foi realizado o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O teste de MTT (HANSEN et al., 1989) se baseia na conversão do substrato (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis em cristais de *Formazan*. Para este experimento as células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, e expostas à ação do A $\beta$ <sub>1-40</sub> durante 12 horas.

Foi utilizado o kit de ensaio colorimétrico *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation* (Promega) em que após o período de incubação do A $\beta$ <sub>1-40</sub> há a adição da solução corante (*Dye Solution*) durante quatro horas a 37° C. Neste período as células viáveis fazem a conversão do substrato *tretazolium* (componente do *Dye Solution*) no produto formazan.

Posteriormente, adiciona-se *Solubilization/Stop Solution* durante 1 hora para solubilizar o produto formazan. A leitura do teste foi realizada no leitor de microplaca *Biochrom Asys UVM340 (Biochrom)*, em um comprimento de onda de 570nm. Cada teste foi realizado em triplicata e os resultados apresentados como valores de absorvância (media  $\pm$  desvio padrão).

### **1.2.5 Citometria de fluxo para detecção de células apoptóticas**

As células em estágio inicial de apoptose foram detectadas e distinguidas das células apoptóticas e necróticas formam utilizando a análise por citometria de fluxo celular.

Foi realizada a marcação com PE Anexina V e 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) através do *kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 (BD Biosciences)*.

A anexina V é uma proteína ligante de fosfolípido dependente de  $Ca^{2+}$  que possui elevada afinidade para fosfolípido fosfatidilserina (PS), que no kit utilizado está conjugada com fluorocromos Ficoeritrina (PE) *PE Annexin V*, mantendo sua alta afinidade para PS, e atuando como uma sonda sensível para análise de citometria de fluxo de células que se encontram em estágio inicial de apoptose.

Já a utilização de 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) atua como um corante juntamente com a PE Annexin V permitindo a identificação de células apoptóticas e necróticas, não distinguindo uma da outra.

Para análise dos dados foi utilizado o programa *FlowJo (Tree Star, Inc.)*. Cada teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de células PE Anexina V e 7-AAD negativas (células viáveis), porcentagem de células PE Anexina V positiva e 7-AAD negativas (células em estágio inicial de apoptose), e porcentagem de células PE Anexina V e 7-AAD positivas (células apoptóticas e necróticas).

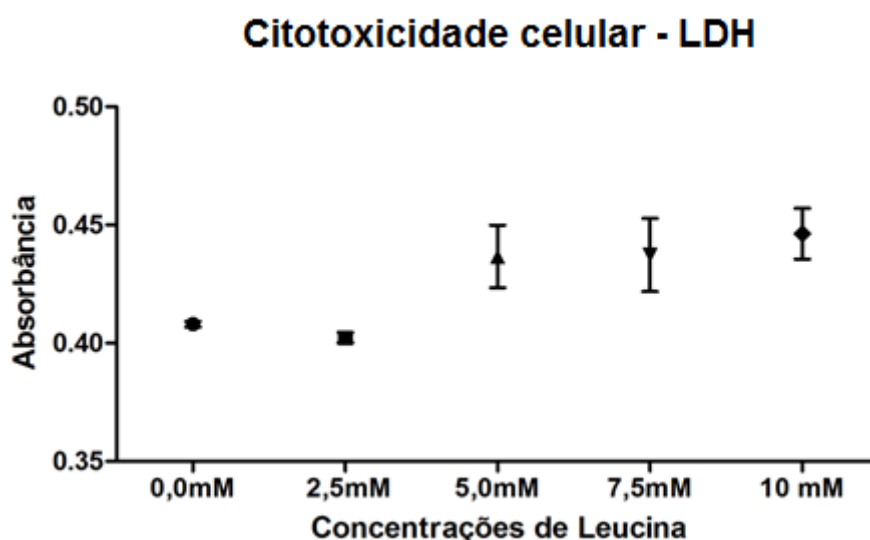
### **1.2.6 Análise estatística**

Para análise dos dados foi utilizado o programa *GraphPad Prism® 5*, para se comparar os diferentes tratamentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de comparações múltiplas Newman-Keuls como

pós-teste. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (Média  $\pm$  DP). Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram  $p < 0,05$ .

## 2 RESULTADOS

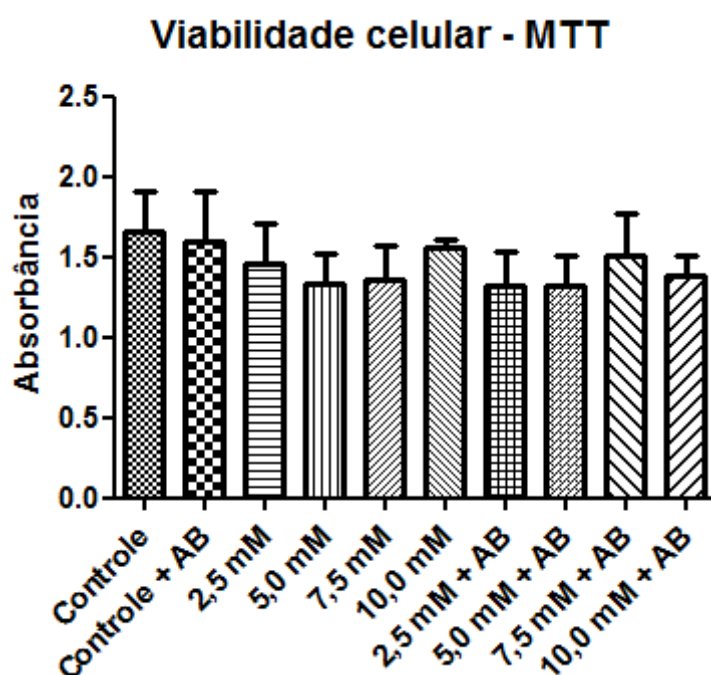
Foi realizada a análise de citotoxicidade por ensaio colorimétrico de LDH para análise de uma curva de concentração de leucina para avaliar se o aminoácido leucina *per se* poderia ser citotóxico para as células SH-SY5Y. Porém, como observado na figura 3, não houve diferenças estatísticas entre nenhum dos pontos da curva de concentração de leucina (Con =  $0,41 \pm 0,00$ ; Leu 2,5 mM =  $0,40 \pm 0,00$ ; Leu 5,0 mM =  $0,44 \pm 0,02$ ; Leu 7,5 mM =  $0,44 \pm 0,003$ ; Leu 10,0 mM  $0,45 \pm 0,02$ ).



**Figura 3** – Efeito do tratamento com diferentes concentrações do aminoácido leucina na absorbância medida pela análise de lactato desidrogenase (LDH) em células SH-SY5Y (neuroblastoma humano), não houve diferença estatística em nenhum dos pontos da curva.  $p = 0,046$ . Utilizado Newman-Keuls como pós-teste. Valores de média  $\pm$  DP.

A análise colorimétrica de MTT foi utilizada para avaliar a toxicidade do tratamento de diferentes concentrações de leucina (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5mM e 10 mM) por 1,5 h seguido ou não do tratamento de  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{A}\beta_{1-40}$  por 12 horas nas células SH-SY5Y. A figura 4 mostra que não houve diferença estatística em nenhum dos pontos de tratamento (Con =  $1,65 \pm 0,61$ ; Com +  $\text{A}\beta$  =  $1,60 \pm 0,75$ ; Leu 2,5 mM =  $1,46 \pm 0,60$ ; Leu 5,0 mM =  $1,33 \pm 0,46$ ; Leu 7,5 mM =  $1,36 \pm 0,53$ ; Leu 10,0 mM  $1,56 \pm 0,11$ ; Leu 2,5 mM +  $\text{A}\beta$  =  $1,32 \pm 0,52$ ; Leu 5,0 mM +  $\text{A}\beta$  =  $1,32 \pm 0,47$ ; Leu 7,5 mM +  $\text{A}\beta$  =  $1,50 \pm 0,67$ ; Leu 10,0 mM +  $\text{A}\beta$  =  $1,38 \pm 0,31$ ).

A figura 5, representa o efeito do tratamento de Leucina por 1,5 horas em diferentes concentrações (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM), com e sem a associação do tratamento de 1  $\mu$ M de A $\beta$  por 24 horas induzindo a apoptose das células SH-SY5Y. As células foram marcadas como PE Anexina V e 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo. Na figura 5A: o quadrante inferior esquerdo representa as células viáveis (PE Anexina V e 7-AAD negativas), o quadrante inferior direito representa as células em etapas iniciais de apoptose (PE Anexina V positivas e 7-AAD negativas) e o quadrante superior, por sua vez, direito representa as células apoptóticas e necróticas.



**Figura 4** – Análise de viabilidade celular através do teste de MTT, das células SH-SY5Y em situação controle, tratadas com peptídeo beta-amiloide 1 $\mu$ M (AB), tratadas com diferentes concentrações de leucina (2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM e 10 mM) e tratadas com diferentes concentrações de leucina e com o peptídeo beta amiloide 1 $\mu$ M (AB), não houve diferença estatística em nenhum dos pontos da curva.  $p = 0,9602$ . Valores de média  $\pm$  DP.

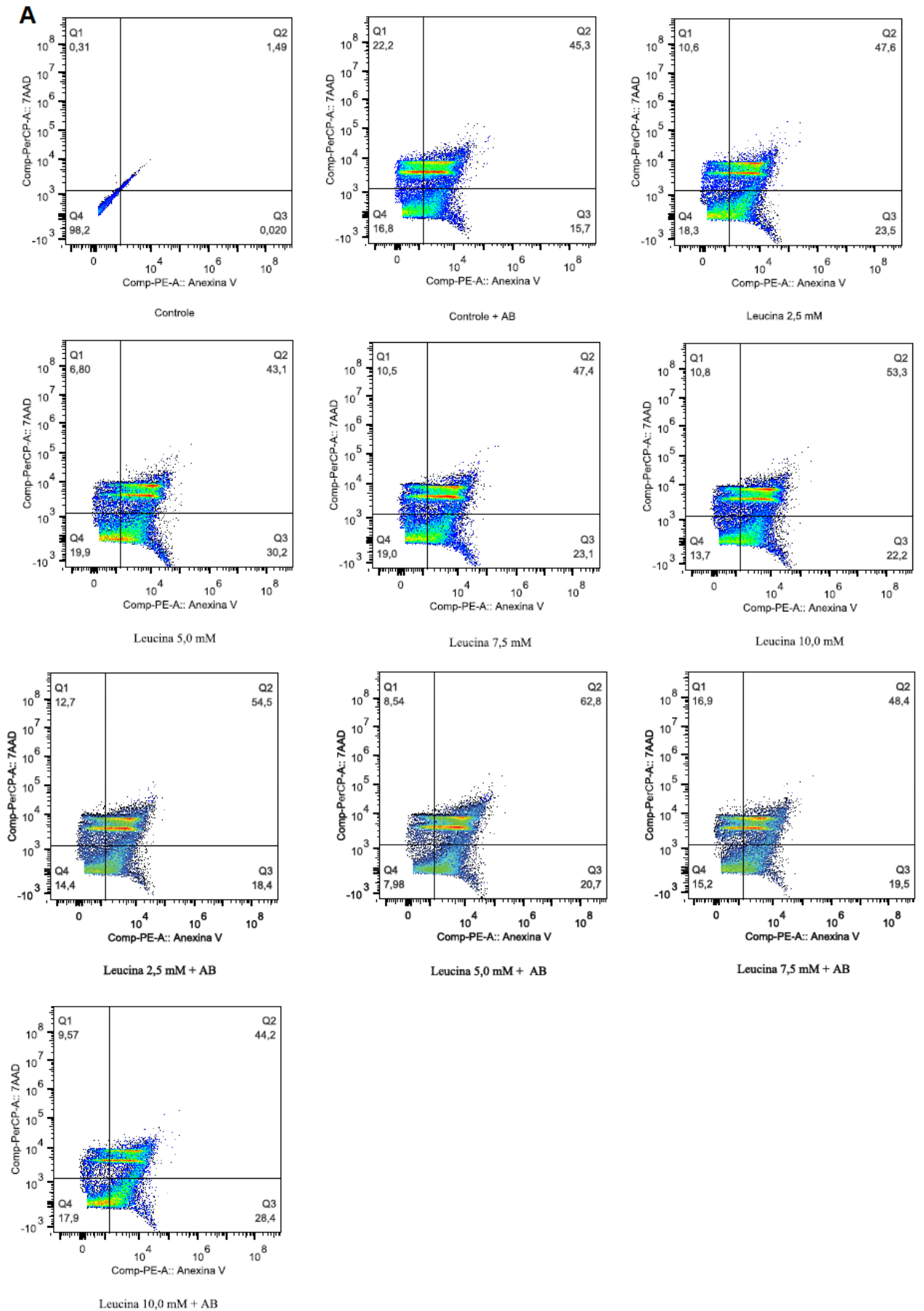
A figura 5B representando células PE Anexina V e 7-AAD negativas, indicando a porcentagem de células viáveis, apresenta diferença entre o grupo controle em relação aos demais grupos de tratamento (Con =  $98,04 \pm 0,69$ ; Com + A $\beta$  =  $12,66 \pm 3,15$ ; Leu 2,5 mM =  $13,87 \pm 5,63$ ; Leu 5,0 mM =  $15,98 \pm 6,13$ ; Leu 7,5 mM =  $18,18 \pm 4,92$ ; Leu 10,0 mM =  $10,90 \pm 8,07$ ; Leu 2,5 mM +

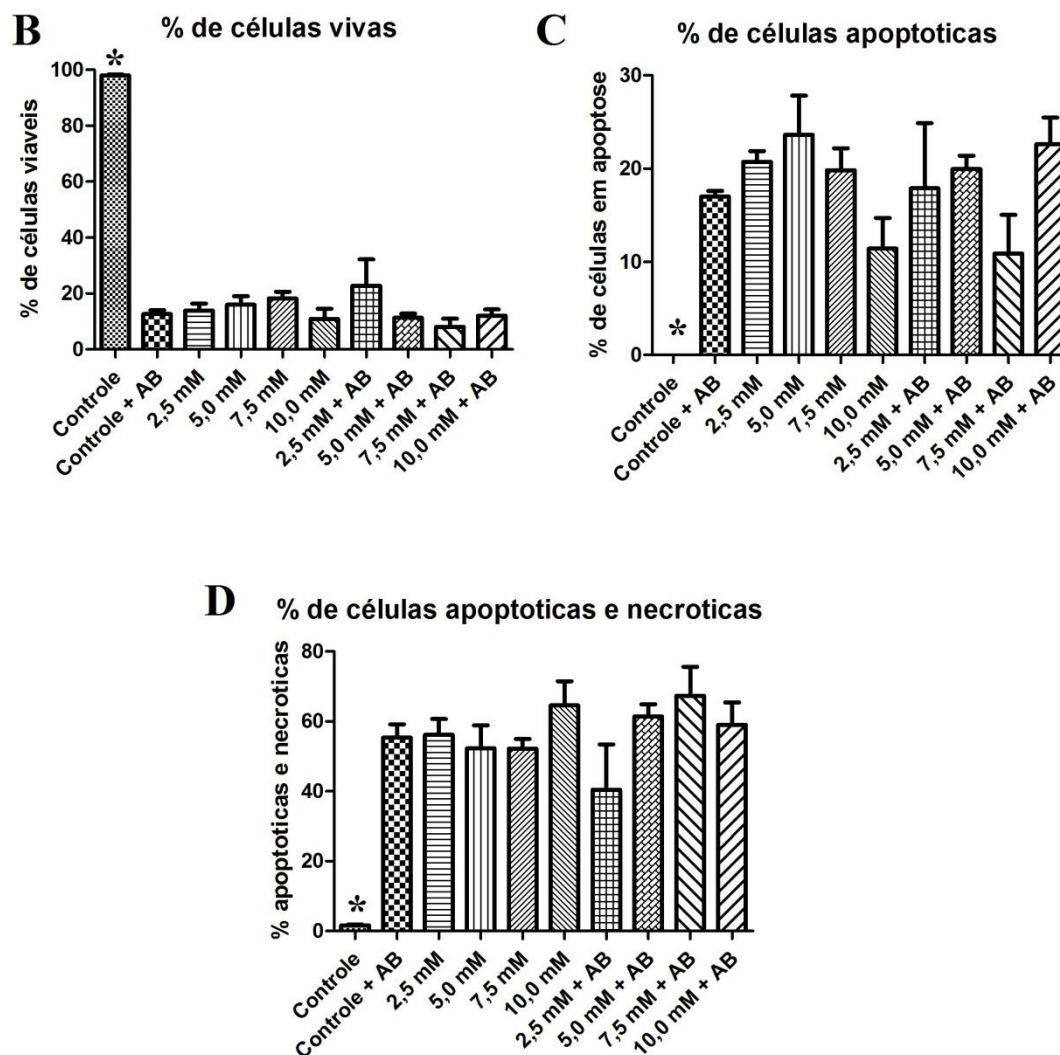


$A\beta = 22,75 \pm 18,98$ ; Leu 5,0 mM +  $A\beta = 11,30 \pm 3,04$ ; Leu 7,5 mM +  $A\beta = 8,07 \pm 5,80$ ; Leu 10,0 mM +  $A\beta = 12,04 \pm 4,45$ ).

A figura 5C representando células PE Anexina V positivas e 7-AAD negativas, indica a porcentagem de células em estágio inicial de apoptose, apresenta diferença entre o grupo controle em relação aos demais grupos de tratamento. (Con =  $0,01 \pm 0,01$ ; Com +  $A\beta = 17,00 \pm 1,35$ ; Leu 2,5 mM =  $20,74 \pm 2,57$ ; Leu 5,0 mM =  $23,65 \pm 8,40$ ; Leu 7,5 mM =  $19,83 \pm 4,73$ ; Leu 10,0 mM =  $11,44 \pm 7,32$ ; Leu 2,5 mM +  $A\beta = 17,90 \pm 13,99$ ; Leu 5,0 mM +  $A\beta = 19,95 \pm 2,88$ ; Leu 7,5 mM +  $A\beta = 10,88 \pm 8,32$ ; Leu 10,0 mM +  $A\beta = 22,65 \pm 5,69$ ).

Por sua vez, a figura 5D representando células PE Anexina V e 7-AAD positivas, indicando a porcentagem de células apoptóticas e necróticas, apresenta diferença entre o grupo controle em relação aos demais grupos de tratamento (Con =  $1,64 \pm 0,56$ ; Com +  $A\beta = 55,34 \pm 8,59$ ; Leu 2,5 mM =  $56,20 \pm 10,02$ ; Leu 5,0 mM =  $52,30 \pm 13,17$ ; Leu 7,5 mM =  $52,25 \pm 5,37$ ; Leu 10,0 mM =  $64,54 \pm 15,63$ ; Leu 2,5 mM +  $A\beta = 40,46 \pm 25,95$ ; Leu 5,0 mM +  $A\beta = 61,40 \pm 7,06$ ; Leu 7,5 mM +  $A\beta = 67,35 \pm 16,53$ ; Leu 10,0 mM +  $A\beta = 59,00 \pm 12,80$ ).





**Figura 5** – Efeito do tratamento de Leucina por 1,5 horas em diferentes concentrações (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM), com e sem a associação do tratamento de 1  $\mu$ M de A $\beta$  por 24 horas induzindo a apoptose das células SH-SY5Y. A) As células foram marcadas como PE Anexina V e 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo. B) Células PE Anexina V e 7-AAD negativas, indicando a porcentagem de células viáveis,  $p < 0,0001$ . C) Células PE Anexina V positivas e 7-AAD negativas, indicando a porcentagem de células em estágio inicial de apoptose,  $p < 0,05$ . D) Células PE Anexina V e 7-AAD positivas, indicando a porcentagem de células apoptóticas e necróticas,  $p < 0,0001$ . Valores de média  $\pm$  DP.

### 3 DISCUSSÃO

Estudos demonstram que a indução do estresse oxidativo pelo A $\beta$  exerce um importante papel no desencadeamento da excitotoxicidade neuronal o que pode resultar no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. (BUTTERFIELD et al., 2001).

A indução de toxicidade pelo A $\beta$  nas células neuronais ocorre de diversas maneiras, envolvendo: a apoptose (LI et al., 1996), a disfunção mitocondrial, a ativação do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) (KALTSCHMIDT et al., 1997), o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (BEHL et al., 1992; PARK et al., 2008) e a ativação da via das caspases (QUIN et al., 2009).

Vias pró e anti-apoptóticas celulares envolvem a ativação de proteínas Bax e Bcl-2. A Bcl-2 é um importante regulador da integridade mitocondrial, inibindo a liberação mitocondrial do Cyt c. Por sua vez a proteína pró-apoptótica Bax que é ativada em condições de estresse, atua na liberação mitocondrial do Cyt c (YANG et al., 1997), sendo portanto a relação Bax/Bcl-2 correlacionada com a indução da apoptose.

Estudo realizado por Wang et al. (2009) com células SH-SY5Y tratadas com A $\beta_{25-35}$  mostra que houve aumento de 2,4 vezes na proporção Bax/Bcl-2, induzindo conseqüentemente maior apoptose celular. Efeito este demonstrado pela redução no número de células viáveis através da análise colorimétrica de MTT.

Outra importante via de ativação da apoptose celular envolve a ativação da via das caspases, sendo a caspase-3 um dos principais efetores neste processo. Fato este que se faz presente em estudos como o de Quin et al. (2009), que mostra aumento no conteúdo de caspase-3 avaliado pela análise de *western blot* após o tratamento de A $\beta_{25-35}$  em cultura primária de neurônios do córtex pré-frontal de ratos.

Dado este que se correlaciona com os resultados de Mulik et al. (2010), mostrando aumento de 37,6% do conteúdo de caspase-3 após o tratamento de A $\beta_{1-42}$  por 24 horas em cultura de células SH-SY5Y.

A exacerbação de A $\beta$  no cérebro é responsável por interferir na sinalização celular, influenciando várias funções celulares fundamentais,

umentando assim a síntese de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão em neurônios e na micróglia (KAWAMOTO et al., 2008).

A transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 é modulada pela ativação do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) (KALTSCHMIDT et al., 1994).

O NF- $\kappa$ B quando em condições fisiológicas exerce importante papel na regulação da plasticidade sináptica e no desenvolvimento e sobrevivência das células neuronais, modulando a atividade de fatores neurotróficos, neurotransmissores e citocinas. Entretanto, a atividade excessiva do NF- $\kappa$ B e de seus genes alvos está diretamente correlacionada com o desenvolvimento de doenças como Alzheimer (MATTSON; MEFFERT, 2006).

Estudos mostram que a ativação dos receptores glutamatérgicos (kainato e NMDA) modula positivamente a atividade do NF- $\kappa$ B (KALTSCHMIDT et al., 1995; GUERRINI et al., 1995).

Vindo de encontro, estudo realizado por Kawamoto et al. (2008) mostra que o A $\beta$ <sub>1-40</sub> exerce efeito dose e tempo dependente na indução de NF- $\kappa$ B em cultura primária de cerebelo de ratos *Wistar*, em que o pico de ativação ocorre com 1  $\mu$ M após 12 horas.

Por outro lado, altas doses de aminoácido leucina têm sido amplamente utilizadas entre atletas e, em muitos casos por praticantes de exercício físico regular que visam aumento de desempenho físico.

Trabalhos mostram que o aminoácido leucina pode alterar o metabolismo do glutamato no sistema nervoso central levando a maior suscetibilidade a excitotoxicidade (YUDKOFF, 1994; 1997, DAIKHIN; YUDKOFF, 2000)

No cérebro o glutamato liberado nas fendas sinápticas é rapidamente captado pelos astrócitos e convertido a glutamina por ação da enzima glutamina sintetase, a glutamina então é liberada pelos astrócitos no espaço extracelular para ser captada pelos neurônios, onde é novamente convertida a glutamato, liberando amônia que será direcionado para os astrócitos para a manutenção do ciclo.

Com a fácil transposição do aminoácido leucina pela barreira hematoencefálica e seu direcionamento para os astrócitos onde poderá com facilidade ser metabolizada, participando da via do glutamato/glutamina, com

isso, poderá aumentar a excitotoxicidade e conseqüentemente a apoptose celular (BIXEL; HUTSON; HAMPRECHT, 1997;. YUDKOFF et al, 1996;. YUDKOFF, 1997; HUTSON et al. 2005; JAZ et al. 2001).

A apoptose celular é um importante processo que ocorre em diversos sistemas biológicos, entretanto a ativação excessiva de vias apoptóticas implicam no desenvolvimento de diversas doenças, como as doenças neurodegenerativas (ARENDS; WYLLIE, 1991; COHEN et al., 1992; THOMPSON, 1995).

O desenvolvimento da apoptose celular é caracterizada por uma série de distintas alterações morfológicas e bioquímicas, sendo a principal forma de morte celular (NICHOLSON, 1996, ARENDS; WYLLIE, 1991, COHEN et al., 1992, THOMPSON, 1995).

O processo de apoptose celular é caracterizado pela condensação e fragmentação da cromatina, compactação das organelas citoplasmáticas, dilatação do retículo endoplasmático, diminuição do volume celular, e alterações na membrana celular, que por sua vez resultam em reconhecimento e fagocitose da célula apoptótica (ARENDS; WYLLIE, 1991).

Uma série de análises tem sido desenvolvidas para avaliar o efeito de neurotoxinas em linhagens de células (SCHUBERT et al., 1992; SCHUBERT; BEHL, 1993; BEHL et al., 1992; BEHL et al., 1994). A análise de citotoxicidade baseada na liberação de LDH pelas células é, rotineiramente, utilizada para quantificação da citotoxicidade em cultura de células neuronais, refletindo o efeito do tratamento da substância de interesse sobre a lise da membrana das células na cultura (CHOI, 1987; FENG et al., 2013; KAWAMOTO et al., 2008)

Neste sentido, inicialmente, buscamos avaliar o efeito do tratamento de diferentes concentrações (2,5mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10,0 mM) do aminoácido leucina sobre a cultura de células SH-SY5Y através da análise de citotoxicidade pela liberação de LDH, para saber se a leucina *per se* poderia exercer algum efeito tóxico sobre esta linhagem clone de neuroblastoma humano.

Nossos dados apontam que não houve diferenças estatísticas entre nenhum dos pontos da curva de concentração de leucina, como observado na figura 3.

Outra importante alternativa de mensuração da viabilidade celular é baseada na conversão do substrato de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em cristais de *Formazan*, sendo a cadeia transportadora de elétrons responsável pela redução de MTT, através de dois principais sítios: a ubiquinona e o citocromo oxidase (SLATER et al., 1963).

A análise colorimétrica de MTT reflete, portanto a integridade da cadeia transportadora de elétrons (BEHL et al., 1994), sendo bem estabelecido que durante o desenvolvimento da apoptose celular ocorre a liberação mitocondrial do citocromo c oxidase (YANG et al., 1997), refletindo assim a perda de viabilidade celular (BEHL et al., 1994).

Vindo de encontro a este fato, nos buscamos avaliar o efeito do tratamento de Leucina por 1,5 horas em diferentes concentrações (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM), com e sem a associação do tratamento de 1  $\mu$ M de A $\beta$  por 12 horas para saber se principalmente a associação de leucina com o A $\beta$  poderia exercer algum efeito tóxico sobre a linhagem clone de neuroblastoma humano, SH-SY5Y.

No entanto, como observado na figura 4 não houve diferença estatística em nenhum dos pontos de tratamento.

Adicionalmente, durante o processo de apoptose celular pode-se notar diversas alterações na membrana das células, dentre elas, a exposição de fosfatidilserina (FADOK et al., 1992), um fosfolípido carregado negativamente, predominantemente presente do lado interno da membrana celular (OP DEN KAMP, 1979).

Já a anexina é uma família de proteínas intracelular ligante de fosfolípido dependente de  $Ca^{2+}$ , com atividade descrita em diversos organismos, e que atuam em múltiplos aspectos da biologia celular, que incluem: a regulação do tráfego entre a membrana celular, ativação de canais de membrana, transdução do sinal mitogênico, entre outros (RAYNAL; POLLARD, 1994).

Quando utilizada marcação da anexina V para a detecção de células em estágio inicial de apoptose, através da análise de citometria de fluxo, a anexina V é conjugada a fluorocromos como a Ficoeritrina (PE) ou o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Sendo assim, as células positivas para o fluorocromos

conjugado a anexina V representam as células em estágio inicial de apoptose (VERMES et al., 1995).

Para se distinguir as células em estágio inicial de apoptose das células, em estágio final de apoptose e necróticas através da análise de citometria de fluxo são utilizados marcadores fluorescentes com alta afinidade ao DNA, como: a 7-amino-actomicina (7-AAD) ou o iodeto de propidium (PI) (VERMES et al., 1995). Sendo assim, as células em estágio inicial de apoptose são positivas para o fluorocromos conjugado a anexina V, e negativas ao marcador fluorescente com alta afinidade ao DNA, as células em estágio final de apoptose e/ou necróticas são positivas para ambos os marcadores, enquanto que as células viáveis são negativas para ambos os marcadores.

De acordo com os dados apresentados na figura 5 notamos que diferentemente do que estava sendo apresentado nas outras análises, o tratamento *per se* com o aminoácido leucina aumenta o número de células em estágio inicial e final de apoptose quando comparado com o grupo controle, assim como o tratamento das células de neuroblastoma com o peptídeo beta-amilóide. Mas, que não houve efeito aditivo do tratamento do aminoácido leucina com o tratamento com o peptídeo beta-amilóide sobre a morte celular.

Nossos dados vêm de encontro ao que já se vem discutindo na literatura de que o aminoácido leucina poderia aumentar a citotoxicidade de células neuronais através da sua possível interação com a via do glutamato (VANCORE, 2003, PISCOPO et al., 2011, YUDKOFF et al., 2001; 2005).

Adicionalmente, dados publicados por Contruscieri et al., (2009), que buscou avaliar o efeito do tratamento de BCAAs em cultura primária do hipocampo e do córtex cerebral de embriões de ratos *Wistar*, mostra que concentrações elevadas de BCAAs (valina 2,5 mM, 2,5 mM de leucina, isoleucina 2,5 mM) exerce efeito neurotóxico aumentando a excitotoxicidade em neurônios corticais, mas, que este efeito não é notado nos neurônios do hipocampo, e que tal efeito neurotóxico é resultado da maior estimulação dos receptores NMDA.

O nosso trabalho, por sua vez, buscou avaliar diferentes doses do aminoácido leucina associada ou não com o tratamento do peptídeo beta-amilóide sobre a excitotoxicidade em células de neuroblastoma humano que



são amplamente utilizadas na literatura (SINGH; KAUR, 2007, KUME et al., 2008, GUARNIERI et al., 2009, MOLLEREAU et al., 2007).

Os dados aqui apresentados sugerem que o tratamento com o aminoácido leucina por 1,5 horas exerce efeito neurotóxico em cultura de células clonais de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, e que não houve efeito aditivo quando foi adicionado o aminoácido leucina em diferentes concentrações (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10,0 mM) ao meio de cultura associado ao tratamento de 1  $\mu$ M de A $\beta$  durante 12 horas.

Desconsiderando assim a hipótese inicial de que o tratamento de células neuronais com o aminoácido leucina em diferentes concentrações associado ao tratamento do peptídeo beta-amilóide poderia aumentar a morte celular. Mas, vindo de encontro aos dados em parte apresentados na literatura de que o aminoácido leucina poderia aumentar a excitotoxicidade e apoptose celular e, apresentando resultados aditivos em relação ao tratamento das células neuronais com diferentes concentrações de leucina.

Notamos, também, que a análise através da marcação de um fluorocromo conjugado a anexina V, associado a um marcador fluorescente com alta afinidade ao DNA, se mostra mais eficiente na distinção das células viáveis das células apoptóticas e necróticas, quando comparado a análise colorimétrica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

## 4 Conclusão

1. Ao analisarmos a citotoxicidade em modelo de cultura de células SH-SY5Y após tratamento com o aminoácido leucina em concentrações de 2,5mM, 5,0mM, 7,5mM e 10mM durante 1,5 horas através do ensaio colorimétrico quantitativo de lactato desidrogenase (LDH) observamos que não houve diferenças estatísticas entre nenhum dos pontos da curva de concentração de leucina;
2. Ao analisarmos a viabilidade celular em modelo de cultura de células SH-SY5Y após tratamento com 1 $\mu$ M peptídeo beta-amilóide durante 12h com ou sem a associação com o aminoácido leucina em concentrações de 2,5mM, 5,0mM, 7,5mM e 10mM durante 1,5 horas através do teste de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) observamos que não houve diferença estatística em nenhum dos pontos de tratamento;
3. Ao analisarmos a morte celular (apoptose) induzida pelo peptídeo beta-amilóide em modelo de cultura de células SH-SY5Y em condições controle e na presença de leucina, através da marcação de PE Anexina V com 7-Amino-Actinomycina (7-AAD) observamos que:
  - a) As células PE Anexina V e 7-AAD negativas, indicando a porcentagem de células viáveis, apresenta diferença entre o grupo controle em relação aos demais grupos de tratamento;
  - b) As células PE Anexina V positivas e 7-AAD negativas, indicando a porcentagem de células em estágio inicial de apoptose, apresenta diferença entre o grupo controle em relação aos demais grupos de tratamento; e
  - c) As células PE Anexina V e 7-AAD positivas, indicando a porcentagem de células apoptóticas e necróticas, apresenta diferença entre o grupo controle em relação aos demais grupos de tratamento.
4. Não houve efeito aditivo da adição do aminoácido leucina no meio de cultura associado ao peptídeo beta-amilóide sobre a apoptose celular.

5. A análise de citometria de fluxo utilizando os marcadores PE Anexina V e 7-AAD se mostraram mais eficientes na detecção da morte celular, quando comparados com as outras análises.

## REFERÊNCIAS

ARENDS, M. J.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, v. 32, p. 223-54, 1991.

AUESTAD, N. et al. Fatty acidoxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 1376–1386, 1991.

BEHL, C. et al. Vitamin Eprotects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 788, p. 944-952, 1992.

BEHL, C. et al. Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. **Cell**, v. 77, p. 817-827, 1994.

Bertram L.; Tanzi R.E. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. **Nat Rev Neurosci.** Oct;9(10):768-78. 2008

BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLER, B. A. Morphology and growth,tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastomacellsin continuous culture. **Cancer Res**,v. 33, p. 2643-2652, 1973.

BIXEL, M. G.; HAMPRECHT, B. Metabolism of branched-chain aminoacids in astroglial-rich primary culture. **J. Neurochem.**, v. 63, p. S62A, 1994.

BIXEL, M. G.; HUTSON, S. M.; HAMPRECHT, B. Cellular distribution ofbranched-chain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 45, p. 685–694, 1997

BUTTERFIELD, D. et al.Evidenceof oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central rolefor amyloid beta-peptide. **Trends Mol. Med.**, v. 7, p. 548–554, 2001.

CAMILLERI A et al. Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols. **Biochimica et BiophysicaActa**, 1828, 2532–2543, 2013

CHOI, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci.**, v. 7, p. 369-379, 1987.

CERNAIANU, G. et al. All-trans retinoic acid arrests neuroblastomacells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brainderivedneurotrophic factor treatment adds modest benefit. **J. Pediatr. Surg.**, v. 43, p. 1284-1294, 2008.

CICCARONE, V. et al. Phenotypic diversification in human neuroblastomacells:expression of distinct neural crest lineages. **Cancer Res.**, v. 49, p. 219-225, 1989.

CONTRUSCIERE V et al. Branched-chain amino acid induce neurotoxicity in rat cortical cultures. **Neurotox Res**, 17:392-398 2009

COHEN, J. J. et al. Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annu Rev Immunol.**, v. 10, p. 267-93, 1992.

DAFFNER KR. Promoting successful cognitive aging: a comprehensive review. **J Alzheimers Dis**, v.19, 2010.

DANBOLT, N. C. The high affinity uptake system for excitatory aminoacids in the brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 44, p. 377–396, 1994

DAIKHIN Y.; YUDKOFF M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. **JNutr.** Apr;130(4S Suppl):1026S-31S, 2000.

DECKER T.; LOHMANN-MATTHES LM. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **J Immunol Methods.** Nov 25;115(1):61-9. 1988

EDBAUER, D. et al. Reconstitution of gamma-secretase activity. **Nat Cell Biol**, v. 5, 2003.

ERECINKA, M.; SILVER, I. A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 35, p. 245–296, 1990.

FADOK V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol.** Apr 1;148(7):2207-16. 1992

FAGERSTRÖM, S. et al. Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. **Cell Growth Differ.**, v. 7, p. 775-785, 1996.

FENG X. et al. Resveratrol inhibits  $\beta$ -amyloid-induced neuronal apoptosis through regulation of SIRT-ROCK 1 signaling pathway. **Plos One** 8(3), 2013

Fillenz, M. (1995) Physiological release of excitatory amino acids. **Behav. Brain Res.** 71: 51–67.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. **Brain Res. Bull.**, v. 45, p. 233–238, 1998

GÖTZ, J.; ITTNER, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, 2008.

GUARNIERI, S. et al. Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Int J Dev Neurosci.**, v. 27, p. 135-147, 2009.

GUERRINI, L.; BLASI, F.; DENIS, D. S. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, p. 9077–9081, 1995.

HAMPRECHT, B.; et al. Metabolism of glucogenic and ketogenic amino acids and energy metabolism in astroglial cells. **J. Neurochem.**, v. 64 p. S110A (abs.), 1995.

HANSEN, M. B. et al. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol Methods**, v. 119, 1989.

HARDY J.A.; HIGGINS G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**. Apr 10;256(5054):184-5. 1992

HUTSON, S. M.; WALLIN, R.; HALL, T. R. Identification of mitochondrial branched chain aminotransferase and its isoforms in rat tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 15681–15686, 1992

HUTSON S.M. et al. Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. **J Nutr**. Jun;135(6 Suppl):1557S-64S. 2005

JOSHI, S. et al. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Oncogene**, v. 25, p. 240-247, 2006.

KALTSCHMIDT, C. et al. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. **Mol Cell Biol**, v. 14, p. 3981–3992, 1994.

KALTSCHMIDT, C.; KALTSCHMIDT, B.; BAUERLE, P. A. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 92, p. 9618–9622, 1995.

KALTSCHMIDT, B. et al. Transcription factor NF-kappa B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, p. 2642–2647, 1997

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 10, n. 3, p. 381-391, 2000.

KAWAMOTO, E. M. et al. Amyloid  $\beta$ -peptide activates nuclear factor- $\kappa$ B through an N-Methyl-D-Aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. **J of Neuroscience Research**, v. 86, 2008.

KRISTIAN, T.; SIESJO, B. K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, v. 29, p. 705–718, 1998.

KUME, T. et al. Dibutyl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into an adrenergic phenotype. **Neurosci Lett.**, v. 443, p. 199-203, 2008.

LAVENIUS, E. et al. Basic FGF and IGF-I promote differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells in culture. **Growth Factors**, v. 10, p. 29-39, 1994.

LI, Y. et al.  $\beta$ -Amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. **Brain Res.**, v. 738, p. 196–204, 1996.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K. P.; NOREMBERG, M. D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science**, v. 195, p. 1356–1358, 1977.

MATTSON, M. P.; MEFFERT, M. K. Roles for NF- $\kappa$ B in nerve cell survival, plasticity and disease. **Cell Death Differ.**, v. 6, p. 1–9, 2006.

MCENTEE, W. J.; CROOK, T. H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. **Psychopharmacology**, v. 111, p. 391–401, 1993.

MOLLEREAU, C.; ZAJAC, J. M.; ROUMY, M. Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors. **Peptides**, v. 28, p. 1125-1128, 2007.

MULIK, R. S. et al. ApoE3 mediated poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles containing curcumin: study of enhanced activity of curcumin against beta amyloid induced cytotoxicity using in vitro cell culture model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 3, 2010.

NICHOLSON, D. W. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. **Nat Biotechnol.**, v. 14, n. 3, p. 297-301, 1996.

NOREMBERG, M. D.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. **Brain Res.**, v. 161, p. 303–310, 1979.

OP DEN KAMP J. A. Lipid asymmetry in membranes. **Annu Rev Biochem.** 48:47-71. 1979

PARK, S. et al. Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 2881–2887, 2008.

PISCOPO P et al. Altered oxidative stress profile in the cortex of mice fed an enriched branched-chain amino acids diet: possible link with amyotrophic lateral sclerosis? **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, 2011.

QIN, X. et al. Potential protection of curcumin against amyloid induced toxicity on cultured rat prefrontal cortical neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 463, p. 158–161, 2009.

RAYNAL, P.; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1197, p. 63-93, 1994.

SCHUBERT, D.; KIMURA, H.; MAHER, P. Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, p. 8284-8288, 1992.

SCHUBERT, D.; BEHL, C. The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. **Brain Res.**, v. 629, n. 275-282, 1993.

SELKOE D. J. Alzheimer's disease. In the beginning... **Nature**. Dec 12;354(6353):432-3. 1991

SINGH, J.; KAUR, G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. **Brain Res.**, v. 1154, p. 8-21, 2007

SINGH-MANOUX, A. et al. Timing of onset of cognitive decline: results from Whitehall II prospective cohort study. **BMJ**, v. 5, n. 344, 2012.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies of succinate reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochim Biophys. Acta.**, v. 77, p. 383-393, 1983.

SMITH, Q.R.; et al. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 1651-1658, 1987.

TAKAHASHI, M. et al. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 401-409, 1997.

TANAKA, K. et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science**, v. 276, p. 1699-1702, 1997.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 10, n. 267, p. 1456-62, 1995.

VANCORE, N. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. **Neurology**, v. 61, 2003.

VANCORE, N. et al. Amyotrophic lateral sclerosis in an Italian professional soccer player. **Parkinsonism Rel Disord**, v. 12, 2006.

VASSAR, R. et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. **Science**, v. 286, 1999.



VERMES I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**. Jul 17;184(1):39-51, 1995

WANG, H. et al. Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against  $\beta$ -amyloid-induced cell injury. **Brain research**, v, 4, n. 1283, p. 139-47 2009.

YUDKOFF, M. et al. Inter-relationships of leucine and glutamate in cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 62, p. 1192–1202, 1994.

YUDKOFF M. et al. Neuronal metabolism of branched-chain amino acids: flux through the aminotransferase pathway in synaptosomes. **J Neurochem**. May;66(5):2136-45., 1996

YUDKOFF, M. Brain Metabolism of Branched-Chain Amino Acids. **GLIA**, v. 21, p.92–98, 1997.

YUDKOFF, M. et al. Brain amino acid metabolism and ketosis. **Journal of Neuroscience Research**, v.66, p. 272–281, 2001.

ZANUTO, R. et al. **Biologia e bioquímica: bases aplicadas às ciências da saúde**. São Paulo: Phorte, 2011.