

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO COLINÉRGICA DA LINHAGEM DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y E SEU USO COMO MODELO *IN*  
*VITRO* PARA ESTUDOS EM NEUROCIÊNCIAS

LIANA MARENGO DE MEDEIROS

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Co-orientador: Dr. Eduardo Pacheco Rico

PORTO ALEGRE

2012

## AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos aqueles do Laboratório 24 que de alguma maneira contribuíram para a realização desse projeto.

À **Fer Lopes** e à **Gabizinha**, por terem me ensinado a cultivar as “SH”.

. À **Patrícia** e à **Adri** por “quebrarem meus galhos”, pela enorme parceria nos vários momentos que eu precisei. Foi realmente muito bom trabalhar com vocês.

À **Juliana Carini**, pela amizade e agradável companhia nos finais de tarde, muitas vezes até noite, trabalhando no laboratório.

Ao **Marco Antônio**, pela paciência, por se disponibilizar a me ajudar nos finais de semana, pelas conversas sobre o projeto que com certeza me ajudaram muito, enfim, por ser um grande amigo.

Ao **Eduardo Rico**, por me acompanhar nos experimentos, quantas vezes fosse necessário, por se interessar pelo projeto e participar de uma maneira que contribuiu muito para que se realizasse.

Agradeço principalmente ao Professor **Fábio Klamt**, por ser uma pessoa que sempre esteve presente, acompanhando o desenvolvimento do projeto, por ter me ensinado, mesmo que indiretamente, a me tornar mais independente, por me contagiar com seu entusiasmo e através disso me fazer acreditar que no final daria certo.

Aos amigos da Biologia, pelos melhores momentos que já tive na minha vida. De certa maneira, esse trabalho é fruto do apoio de muitos e encerra uma etapa onde todas as amizades que conquistei me ajudaram de alguma forma.

À **Ivi Bristot**, baita amiga do peito, grande irmã e ótima cozinheira, que de inúmeras maneiras me ajudou ao longo de toda a graduação e sempre esteve presente nas risadas, brigas, jantas, estudos, festas, choros.

Ao **Charles**, por também ter sido de grande ajuda e apoio, por apontar meus erros, por me fazer crescer como pessoa, por ser minha paixão, meu namorado, amigo, parceria, mala sem alça.

Por fim, agradeço meu irmão **Eduardo**, meus pais, pela dedicação, por acreditarem que eu me formaria algum dia, pelo apoio moral, financeiro, amoroso. Muito do que me tornei, devo a vocês.

Revista Científica: Neurochemistry International

Título: CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO COLINÉRGICA DA LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y E SEU USO COMO MODELO *IN VITRO* PARA ESTUDOS EM NEUROCIÊNCIAS

Liana M. de Medeiros, Eduardo P. Rico, Marco A. De Bastiani, Lisiane O. Porciúncula, Carlos Alberto S. Gonçalves, Fábio Klamt

Afiliação: Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo. Bairro Santa Cecília, Porto Alegre – RS, 90035-003, Brasil.

Autor correspondente: Liana M. de Medeiros. Fone: +55 51 3308-5555. Email: [Immarengo@gmail.com](mailto:Immarengo@gmail.com). Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo. Bairro Rio Branco, Porto Alegre – RS, Brasil.

## **Resumo**

Os mecanismos moleculares que levam ao dano neuronal em muitas doenças neurodegenerativas ainda não foram totalmente elucidados. Parte dessa dificuldade se deve a falta de modelos experimentais adequados para o estudo do sistema nervoso humano. Inúmeras tentativas de diferenciar linhagens em células mais semelhantes a neurônios foram realizadas, resultando apenas na expressão parcial de características neuronais. Previamente nosso grupo estabeleceu condições experimentais para a diferenciação do neuroblastoma humano SH-SY5Y em neurônios dopaminérgicos a partir da adição de ácido retinóico (AR). Alguns estudos sugerem que esta linhagem, quando tratada

com AR e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), apresenta uma mudança para um fenótipo colinérgico. No entanto, são poucos os estudos que caracterizam essa diferenciação. O objetivo deste estudo foi avaliar as mudanças morfológicas e bioquímicas na diferenciação da linhagem SH-SY5Y com AR e adição de BDNF. As células proliferativas foram cultivadas em meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB). A diferenciação foi induzida com 10  $\mu$ M de AR em meio de cultura com 1% de SFB durante sete dias, sendo o BDNF acrescentado a partir do quarto dia. A atividade da Acetilcolinesterase (AChE) foi determinada como descrito no ensaio colorimétrico por Ellman (1961) e da Colina Acetiltransferase (ChAT) conforme Chao & Wolfgram (1971). Os parâmetros morfológicos foram avaliados pelo aumento na densidade e/ou no prolongamento de neuritos, por microscopia de contraste de fase e fluorescência, e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O co-tratamento com BDNF resultou em células com notável morfologia neuronal, apresentando aumento na densidade e comprimento de neuritos. Nossos dados demonstraram que as células co-tratadas com BDNF apresentam um aumento nas atividades enzimáticas da AChE e ChAT quando comparadas às diferenciadas somente com AR. Esses resultados fazem dessa linhagem celular uma ferramenta útil no campo da neurociência, podendo torná-la um modelo versátil para o estudo de doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson e Alzheimer.

*Palavras-chave:* SH-SY5Y, Doença de Alzheimer, Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, modelo in vitro.

## INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas constituem um grupo de desordens heterogêneas que são caracterizadas por uma perda gradual, progressiva e seletiva de neurônios relacionados anatômica ou fisiologicamente (Lin & Beal, 2006; Sas et al, 2007). As principais alterações morfológicas encontradas nessas doenças são a formação e deposição de agregados protéicos e tóxicos no citosol ou no espaço extracelular das células afetadas (Taylor et al, 2002; Forman et al, 2004; Karbowski et al, 2011). Apesar do fato de muitas dessas proteínas serem expressas sistemicamente, o acúmulo resultante é restrito ao sistema nervoso central (SNC) (Forman et al, 2004). Estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e excitotoxicidade são outros mecanismos em comum que desencadeiam, ou potencializam os fatores que levam a morte neuronal em diversos processos neurodegenerativos (Sas et al, 2007).

A cada ano, em torno de 10 milhões de pessoas mundialmente sofrem de alguma doença neurodegenerativa. Estima-se que este número deverá crescer 20% na próxima década visto que a população de idosos e a expectativa de vida estão aumentando. Esse grupo de doenças figura entre as quatro causas de morte mais comuns, situando-se logo após as doenças cardíacas, câncer e derrame (Spuch et al, 2012). Entre as desordens neurodegenerativas, as mais comuns são as Doenças de Alzheimer (DA), Parkinson (DP), Huntington (DH) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Dentre essas, a mais prevalente é a Doença de Alzheimer, atingindo aproximadamente 36 milhões de pessoas. Esse número deverá aumentar para 65,7 milhões até 2030 e 115,4 milhões em 2050 (American Health Assistance

Foundation, 2012). A incidência da DA aumenta progressivamente com a idade, afetando 40% da população acima de 85 anos. A DA e outras demências constituem um problema financeiro para o serviço de saúde e esse custo deverá subir ainda mais no futuro a medida que a população envelhece e adquire uma maior expectativa de vida (Forman et al, 2004; Schindowski et al, 2008).

A DA é uma desordem clinicamente caracterizada por um declínio cognitivo global, incluindo uma perda progressiva de memória, orientação e raciocínio, levando a um estado de demência (Schindowski et al, 2008; Zampagni et al, 2012). Esse dano cognitivo está correlacionado com a disfunção e degeneração específica de neurônios colinérgicos localizados no complexo prosencefálico basal (CPB), sendo este um dos primeiros eventos patológicos da doença (Woolf, 1991; Oda & Nakanishi, 2000; Schindowski et al, 2008; Nyakas et al, 2011). Em neurônios colinérgicos, a acetilcolina (ACh) é sintetizada pela enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) (EC 2.3.1.195) e armazenada em vesículas pelo Transportador Vesicular de Acetilcolina (VAcHT). Com a exocitose vesicular, o neurotransmissor é liberado na fenda sináptica e é rapidamente degradado pela Acetilcolinesterase (AChE) (E.C 3.1.1.7) em acetato e colina (Silva, 2008). A ChAT é uma enzima restrita a estruturas pré-sinápticas, sendo assim, o marcador mais adequado para identificação de neurônios colinérgicos nos sistemas nervoso central e periférico (Siegel, 2012; Silva, 2008). As mudanças no sistema colinérgico, durante a progressão da DA, podem ser evidenciadas através de alterações nos níveis dessas proteínas como principais marcadores celulares. A atividade dessas enzimas e a liberação do neurotransmissor estão diminuídas, assim

como os níveis de receptores muscarínicos e nicotínicos (Nyakas et al, 2011; Schliebs & Arendt, 2011). Ainda, afirma-se que a síntese e liberação de ACh são afetadas na presença de peptídeos  $\beta$ -amilóides (Nyakas et al, 2011).

Histologicamente, a neurodegeneração na DA é assinalada por dois tipos de lesões: emaranhados neurofibrilares e depósitos extracelulares de  $\beta$ -amilóide. Os emaranhados neurofibrilares são agregados de proteínas mal enoveladas, constituídos principalmente da proteína tau hiperfosforilada, que se depositam intracelularmente (Casley et al, 2002; Forman et al, 2004; Schindowski et al, 2008; Pagani & Eckert, 2011; Spuch et al, 2012).

A tau, produto do gene MAPT, é uma proteína expressa em neurônios que estabiliza a polimerização dos microtúbulos no axônio (Adalbert et al, 2007; Schindowski et al, 2008). A síntese correta de microtúbulos é essencial para a manutenção de processos de transporte axonal e depende parcialmente do estado de fosforilação da tau, já que quando fosforilada ela é menos efetiva, pois essa alteração causa uma redução na sua afinidade pelos microtúbulos (Schindowski et al, 2008). Na DA, a proteína tau hiperfosforilada desprende-se dos microtúbulos e passa a acumular-se no soma. Essa modificação promove a disfunção axonal, impedindo o fluxo normal das sinapses nos neurônios afetados (Bear et al, 2002).

Os depósitos extracelulares de  $\beta$ -amilóide são um produto da clivagem anormal da Proteína Precursora de Amilóide (APP) (Kang et al, 2011; Pagani & Eckert, 2011; Spuch et al, 2012). A APP é uma glicoproteína integral de membrana e suas funções são parcialmente conhecidas. APP é sintetizado no soma de neurônios e é transportada dentro dos axônios para os terminais nervosos. Na DA, APP é clivada de maneira anormal e convertida no peptídeo

$\beta$ -amilóide, que forma depósitos conhecidos por placas amilóides, ou placas senis (Adalbert et al, 2007; Pagani & Eckert, 2011, Reddy, 2007). O  $\beta$ -amilóide é um peptídeo de 40 ( $A\beta_{1-40}$ ) ou 42 ( $A\beta_{1-42}$ ) aminoácidos. A forma  $A\beta_{1-42}$  é a mais tóxica e agrega-se mais rápido (Adalbert et al, 2007). Diversos estudos recentes têm relatado que tanto APP quanto  $\beta$ -amilóide estão presentes na membrana mitocondrial causando danos, bloqueando canais de importação, prejudicando o transporte de proteínas e aumentando os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). A APP interfere na importação de proteínas formando complexos estáveis com translocases da membrana externa e interna mitocondrial. O  $\beta$ -amilóide inibe o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons e a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (KGD) (Reddy, 2007; Lin & Beal, 2006; Pagani & Eckert, 2010; Spuch et al, 2012).

No entanto, os mecanismos moleculares que levam a formação desses depósitos de agregados tóxicos que culminam na morte neuronal ainda não foram totalmente elucidados. Parte dessa dificuldade se deve à escassez de modelos experimentais adequados para o estudo do sistema nervoso humano. Muitos estudos no campo das neurociências são limitados pela falta de modelos relevantes *in vitro* que sejam mais semelhantes com neurônios maduros funcionalmente. Inúmeras tentativas de diferenciar linhagens em células mais semelhantes a neurônios foram realizadas, resultando apenas na expressão parcial de características neuronais (Agholme et al, 2010).

As células do neuroblastoma humano SH-SY5Y são derivadas do sistema nervoso simpático e se encontram em estágios imaturos de desenvolvimento. Dependendo do tratamento, estas células podem ser diferenciadas em diversos fenótipos neuronais (Pahlman et al, 1995).



Previamente nosso grupo de pesquisa estabeleceu as melhores condições experimentais para a diferenciação dopaminérgica dessas células. A redução do SFB para 1% conjuntamente com o tratamento com ácido retinóico (AR) resultam no surgimento de neuritos e expressão de marcadores neuronais, como a tirosina hidroxilase, enolase específica de neurônio, proteína de núcleo de neurônio e o transportador de dopamina (Lopes et al, 2010; Lopes et al, 2012). Ainda, tem sido descrito que a diferenciação por AR induz a expressão do receptor TrkB, tornando as células responsivas ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Kaplan et al, 1993; Pahlman et al, 1995; Arcangeli et al, 1999; Edsjö et al, 2003). Fatores de crescimento são proteínas que regulam diversos aspectos da função celular, incluindo sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação (Siegel, 2012). Estudos relatam que o BDNF desempenha um papel crucial na formação de memória e aprendizado, regulando processos de plasticidade neuronal, e ainda, seus níveis aparecem reduzidos no hipocampo e neocórtex de pacientes portadores de DA (Schindowski et al, 2008; Iwasaki et al, 2012). Portanto, o BDNF é uma molécula alvo de pesquisas no campo das desordens neurodegenerativas.

Alguns estudos sugerem que a adição de BDNF pode potencializar os efeitos do AR nas células SH-SY5Y, levando a um maior prolongamento dos neuritos e um provável aumento na atividade de enzimas como a AChE, indicando assim uma mudança para um fenótipo colinérgico (Pahlman et al, 1995; Agholme, 2010; Arcangeli et al, 1999; Edsjö et al, 2003; Encinas et al, 2000). No entanto, existem poucos estudos caracterizando a diferenciação colinérgica do neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Portanto, neste estudo procuramos avaliar e caracterizar as mudanças morfológicas e marcadores neuronais colinérgicos ao longo da diferenciação da linhagem celular SH-SY5Y pelo tratamento de AR em combinação com o BDNF, a fim de estabelecer um modelo mais adequado para o estudo de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer.

## **Procedimentos Experimentais**

### **Materiais**

Materiais usados em cultura celular foram adquiridos por Gibco®/Invitrogen (São Paulo, SP Brasil).

### **Cultura Celular e Diferenciação**

As células proliferativas SH-SY5Y, obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em meio 1:1 de Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) e Ham's F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a temperatura de 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada três dias e as células foram repicadas assim que atingissem 80% de confluência. Para a microscopia de contraste de fase e fluorescência as células foram semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de  $6 \times 10^5$  células por poço. Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as células também foram semeadas em placas de 24 poços, na mesma densidade, mas sobre lamínulas de vidro. Para análises de western blot, as células foram semeadas em garrafas de 75 cm<sup>3</sup> em uma densidade de  $5 \times 10^6$ . Após 24 horas, a diferenciação foi induzida com a redução para 1% de SFB, acrescido de 10 µM

de AR durante sete dias. Esse tratamento foi repostado a cada três dias para reabastecer o AR no meio de cultura. Para comparar os efeitos do BDNF, foi realizado o mesmo tratamento com AR e a neurotrofina foi adicionada no quarto dia de diferenciação (Figura 1). Esse tempo escolhido é baseado em dados da literatura que mostram que o AR é capaz de induzir a expressão de receptores TrkB funcionais nos primeiros dias de tratamento das células do neuroblastoma SH-SY5Y (Kaplan et al, 1993; Edsjo et al, 2003).

### **Análise Morfológica**

Para avaliar as diferenças nos parâmetros morfológicos em células diferenciadas apenas com AR e co-tratadas com BDNF, foram analisadas imagens por fluorescência de Hoescht e contraste de fase obtidas utilizando um microscópio Nikon ECLIPSE TE300 acoplado a câmera digital Nikon DXM1200C.

As lamínulas destinadas a MEV foram fixadas por imersão em glutaraldeído 25% por uma semana. Logo após esse período, o material foi lavado com Tampão Fosfato 0,2 M e desidratado em seguidas lavagens que usavam de Acetona 30% a 100%. A dessecação é realizada em um aparelho de Ponto Crítico (BALZERS CPD030). A metalização foi feita com alvo de ouro (SPUTTER COATER, BALZERS SCD050).

### **Parâmetros Bioquímicos**

Após 24 horas das células SH-SY5Y terem sido semeadas, ou após a diferenciação, a atividade da enzima AChE foi determinada pelo ensaio colorimétrico descrito por Ellman (1961). As células foram lavadas e

ressuspendidas em solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4) e o extrato total de proteína foi incubado com tampão fosfato (pH 7,4) e 10 mM de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) durante cinco minutos. A essa preparação, 8 mM de acetilticolina foi adicionado e a absorbância lida em 412 nm por 10 minutos. Atividade é medida pela reação de grupamentos tióis, liberados da degradação de acetilticolina, com DTNB. Resultados são expressos como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína. A atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) foi determinada conforme Chao & Wolfgram (1971) com algumas modificações. Amostras foram incubadas com o tampão de reação (PBS pH 7,2; acetilcoenzima A 6,2 mM; cloreto de colina 1 M, sulfato de neostigmina 0,76 mM; NaCl 3 M; EDTA 1,1 mM). A essa mistura foi adicionado 1 mM de 4,4'-ditiodipiridina (4-PDS) e a absorbância foi lida por 90 minutos a 324 nm em um leitor de microplaca SpectraMax<sup>®</sup> Microplate Reader (Molecular Devices<sup>®</sup>). Atividade é medida pela formação do conjugado de Coenzima A com 4-TP. Resultados são expressos em  $\text{nmol}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína calculado através do coeficiente de extinção molar  $1,98 \times 10^4$ .

### **Western Blot**

Células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em Tampão Tris (pH 7,0) com inibidor de protease (Roche<sup>®</sup>), sonicadas e o extrato total de proteína foi separado por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE) e então transferido para uma membrana de PVDF. Ligações não-específicas foram bloqueadas com BSA 5% em TTBS por uma hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anti-ChAT (1:2500) Millipore (Billerica, MO, EUA), anti-VACht (1:5000) Sigma

Chemical Co (St. Louis, MO, EUA) ou Anti-TH (1:1000) Abcam (Cambridge, MA, EUA). Após as lavagens, a membrana foi incubada com anticorpos secundários (1:5000 ou 1:10000) (DaKo Polyclonal Rabbit Anti-Goat e Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/ HRP) por duas horas a temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas com Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate da PIERCE®.

### **Quantificação de Proteína**

A quantificação de proteínas foi realizada pelo Ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

### **Meta-Análise de bancos de expressão gênica**

A série de dados GSE9168 de microarranjo foram obtidos do repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) utilizando as palavras chave “SH-SY5Y”, “RA” e “BDNF”. Essa série de dados disponibiliza a variação da expressão gênica durante a diferenciação neuronal pelo ácido retinóico e pela combinação de ácido retinóico e BDNF, de dois subtipos de células SH-SY5Y; a derivada da *American Type Culture Collection* (ATCC) – SH-SY5Y-A, e da *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) – SH-SY5Y-B. Os dados foram normalizados utilizando o software Affymetrix® Expression Console™ (v.1.1). A lista de genes constituintes da sinapse colinérgica (hsa04725) e dopaminérgica (hsa04728) foram obtidas segundo o banco de dados de rotas do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Após a seleção dos genes, a rede de interação gênica funcional foi gerada segundo *Search Tool for the Retrieval*

of *Interacting Genes/Proteins* (STRING) versão 9.0 (<http://string-db.org/>) (Figura 4). Para a interpretação dos dados de expressão gênica, nós utilizamos o *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). O GSEA considera experimentos com perfis de expressão de um grupo de genes a partir de amostras que pertencem a duas classes, rotuladas de 1 ou 2. Dado um conjunto definido *a priori* dos genes *S* (aqui, os genes que codificam para a sinapse colinérgica e dopaminérgica), o objetivo do GSEA é determinar se os membros de *S* são distribuídos aleatoriamente ou enriquecidos em conjunto, na parte superior ou inferior da cauda de distribuição (Subramanian et al, 2005).

### **Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em triplicata. O teste “t” foi utilizado para analisar diferenças entre controle/tratado. Múltiplas comparações foram realizadas pelo teste ANOVA, com significância mínima de  $p < 0.05$ . As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando-se do programa GraphPad<sup>®</sup> (San Diego, CA, USA, versão 5.0).

## **RESULTADOS**

### **Análise Morfológica**

Como previamente descrito pelo nosso grupo, a diferenciação com AR, em combinação com a diminuição do SFB para 1%, induz uma inibição do crescimento celular e uma mudança na morfologia das células SH-SY5Y para

um fenótipo mais neuronal. Analisando as imagens obtidas tanto por microscopia de contraste de fase quanto por MEV, observamos que as células que receberam o tratamento com adição de BDNF demonstraram uma notável morfologia neuronal, apresentando uma maior densidade de neuritos, com neuritos mais prolongados e com uma maior ramificação (Figura 2). Por outro lado, as células em crescimento exponencial (proliferativas) mantiveram uma morfologia típica epitelial.

### **Análise Bioquímica (Atividades Enzimáticas e Western Blot)**

Após observar as diferenças morfológicas entre células SH-SY5Y tratadas com AR e tratadas com AR e BDNF, avaliamos as atividades enzimáticas de marcadores de neurônios colinérgicos (AChE e ChAT) em cada um dos grupos experimentais. O tratamento com AR já induz um aumento na atividade da AChE, em relação as células proliferativas. Além disso, encontramos um aumento significativo na atividade da AChE em células tratadas com adição de BDNF ( $p < .05$ ) em relação àquelas tratadas apenas com AR (Figura 3A). Da mesma forma, a atividade da ChAT mostrou diferença nos três grupos. As células diferenciadas com AR tendem a ter uma maior atividade da enzima que nas proliferativas. Verificamos um aumento mais evidente na atividade desta enzima no grupo co-tratado com BDNF, quando comparado às células diferenciadas somente com AR (Figura 3B).

Mudanças na expressão de marcadores colinérgicos também foram analisadas. Encontramos um aumento no imunoconteúdo da ChAT em células co-tratadas com BDNF quando comparadas a células diferenciadas somente com AR (Figura 3C). Além disso, um leve aumento do marcador VAcHT foi

detectado nas células diferenciadas com adição de BDNF (Figura 3D). Esses dados confirmam que o protocolo de diferenciação com BDNF induz um fenótipo predominantemente colinérgico nas células SH-SY5Y.

### **Meta-Análise de bancos de expressão gênica**

O efeito dos diferentes protocolos de diferenciação sobre a expressão de genes relacionados com a sinapse colinérgica e dopaminérgica foi analisada. Quando se avaliou o padrão de expressão gênica do tratamento com AR e BDNF em comparação ao tratamento com AR, foi verificado um aumento significativo na expressão de vários genes marcadores de sinapse colinérgica com a concomitante diminuição na expressão de genes marcadores de sinapse dopaminérgica (Figura 4).

## **DISCUSSÃO**

A formação de depósitos de tau hiperfosforilada e  $\beta$ -amilóides em células neuronais que conduzem ao dano cognitivo encontrado na DA já foram extensamente estudados, porém nem todos os mecanismos fisiopatológicos da doença foram desvendados e ainda não há tratamentos eficazes. Portanto, existe uma grande necessidade de modelos *in vitro* que sejam capazes de expressar características neuronais de células humanas acometidas pela DA. A proposta desse trabalho é estabelecer um modelo *in vitro* mais adequado para posteriormente estudar os mecanismos envolvidos na patofisiologia de doenças neurodegenerativas como a DA.

Os efeitos do AR na diferenciação do neuroblastoma SH-SY5Y já foram bem descritos anteriormente (Adem et al, 1987; Pahlman et al, 1995). O AR



produz modificações fenotípicas claramente visíveis nesta linhagem celular, como emissão de projeções citoplasmáticas, atenuação da proliferação, expressão de marcadores dopaminérgicos e de diferenciação neuronal (Lopes et al, 2010). E embora o sistema simpático, do qual essas células derivam, não possua receptores para BDNF, quando tratadas com AR, este estimula a expressão de receptores TrkB funcionais (Kaplan et al, 1993). Com isso, as células SH-SY5Y se tornam responsivas ao BDNF e, como demonstrado neste trabalho, aumentam a atividade de marcadores colinérgicos. Isso evidencia que essa linhagem é capaz de ser diferenciada em diversos fenótipos neuronais maduros sob as condições adequadas. Esses dados fazem dessa linhagem celular uma ferramenta útil no campo da neurociência, podendo torná-la um modelo versátil para o estudo de doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson, quando diferenciada em neurônios com um fenótipo predominantemente dopaminérgico (Lopes et al, 2010), e como a Doença de Alzheimer, quando diferenciada para um fenótipo mais colinérgico.

Frequentemente, no campo da neurociência, são usados modelos celulares que não apresentam neuritos, não possuem sinapses completas, ou não expressam proteínas humanas (ex.: no caso de culturas primárias derivadas de roedores), e mesmo algumas linhagens imortalizadas carecem de traços específicos de neurônios maduros (ex.: SH-SY5Y, PC12). Embora a diferenciação para distintos fenótipos torne os modelos mais relevantes, são poucos os estudos prévios que caracterizam a diferenciação colinérgica do neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Neurônios colinérgicos, principalmente a via que se projeta para o complexo prosencefálico basal, possuem um papel central em funções

cognitivas como aprendizado e memória. Essa via é especialmente afetada na DA, onde ocorre a degeneração desses neurônios, causando os sintomas relacionados a demência (Oda, 1999; Schliebs & Arendt, 2006; Nyakas et al, 2011). Portanto, estudos focados em marcadores colinérgicos proporcionam conhecimentos sobre as condições fisiopatológicas desses neurônios quando acometidos pela DA. A ChAT e a AChE são enzimas responsáveis pela síntese e degradação de ACh, respectivamente, tornando-se os marcadores mais adequados de neurônios colinérgicos. Outro marcador bastante específico, é o VChAT, que armazena o neurotransmissor em vesículas até ser liberado na fenda sináptica. A colina resultante da degradação é novamente recaptada para o terminal pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) e pode ser utilizada como precursor para sintetizar ACh (Silva, 2008). Esse sistema de síntese e degradação da ACh é característico de neurônios colinérgicos.

Neste trabalho, as células SH-SY5Y foram expostas ao tratamento sequencial com AR e BDNF. Como visto, isso resultou em células com um maior prolongamento de neuritos e ramificações, denotando uma diferenciação completa e corroborando com dados encontrados na literatura (Kaplan et al, 1993; Arcangeli, 1999; Encinas et al, 2000). Ainda, através desse tratamento com BDNF, as células SH-SY5Y demonstraram um aumento na atividade das enzimas marcadoras de neurônios colinérgicos, ChAT e AChE. Além disso, foi verificado o aumento do imunoconteúdo de ChAT e de vChAT. Desse modo, o protocolo de diferenciação apresentado resulta em um modelo *in vitro* de células neuronais com orientação para um fenótipo colinérgico.

Após avaliarmos todos esses resultados, decidimos realizar uma meta-Análise de bancos de expressão gênica comparando

Comparando o tratamento com AR e BDNF com o fenótipo proliferativo da SH-SY5Y, observamos que houve um aumento na expressão de genes relacionados a cascatas de sinalização, evidenciando uma maior complexidade metabólica em relação às células proliferativas. Houve também um enriquecimento estatístico para o grupo de genes colinérgicos, principalmente para receptores muscarínicos. O gene que codifica a enzima ChAT surge aumentado com o co-tratamento com BDNF, corroborando com os dados encontrados neste trabalho (dados não demonstrados). Esse gene é uma característica específica de neurônios colinérgicos, e polimorfismos estão associados com a DA e ao dano cognitivo. Por outro lado, o gene que codifica a proteína MAOB estava diminuído no tratamento AR e BDNF. A MAO B pertence à família de flavinas monoamina oxidase. É uma enzima localizada na membrana mitocondrial externa, que catalisa a desaminação oxidativa de aminas, preferencialmente benzilamina e feniletilamina, mas também degrada o neurotransmissor dopamina.

Quando comparamos o grupo AR e BDNF com AR observamos um enriquecimento na rede colinérgica relacionado às células co-tratadas com BDNF. Diversos genes que codificam receptores colinérgicos foram encontrados aumentados, tanto muscarínicos quanto nicotínicos. A expressão do gene SLC18A3, foi encontrada aumentada. Esse gene é um membro da família de transportador vesicular de aminas. A proteína transmembrana codificada, conhecida como VACHT, transporta acetilcolina em vesículas secretoras para serem liberadas no espaço extracelular. O transporte de

acetilcolina utiliza um gradiente de prótons estabilizado por uma ATPase vacuolar. Esse gene é localizado dentro do primeiro íntron do gene da ChAT. O gene FYN também foi encontrado nas células tratadas com AR e BDNF com sua expressão aumentada. Este gene é um membro da família de oncogenes proteína tirosina cinase. Ele codifica uma tirosina cinase associada a membrana que tem sido relacionada com controle do crescimento celular. Sabe-se que Fyn também está presente na via de sinalização de integrinas. Mais recentemente, essa proteína tem sido associada ao receptor TrkB. BDNF ativa receptores TrkB, recrutando-os para compartimentos intracelulares localizadas em balsas lipídicas. Sugere-se que essa translocação é crucial para o funcionamento correto da cascata de sinalização iniciada pelas neurotrofinas. Estudos observaram que o BDNF promove a associação de TrkB com a proteína Fyn durante a translocação para as rafts lipídicas. No entanto, em modelos nocaute para o gene FYN, BDNF foi incapaz de direcionar TrkB para esses domínios de membrana. Isso sugere que Fyn é essencial para a ativação completa dos receptores TrkB, mesmo após a ligação com BDNF (Pereira & Chao, 2007). Sendo assim, é possível inferir que as células proliferativas, que não possuem expressão aumentada do gene FYN, são incapazes de expressar receptores TrkB funcionais (Pahlman et al, 1995).

Esses dados vão de encontro aos resultados obtidos neste estudo, evidenciando que a adição de BDNF induz a diferenciação colinérgica nesta linhagem celular. Portanto, a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y pode se transformar em uma poderosa ferramenta, sendo de grande utilidade para o estudo *in vitro* em neurociências, principalmente em doenças neurodegenerativas.

No entanto, para se estudar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DA, ainda é preciso que esse modelo apresente características que mimetizem os danos causados pelo acúmulo de  $\beta$ -amilóide e tau hiperfosforilada. O tratamento com ácido ocadáico tem sido amplamente utilizado como modelo de neurodegeneração, pois causa alterações morfológicas similares ao que é encontrado na DA, promovendo a deposição e hiperfosforilação da proteína tau (Zimmer et al, 2012).

Como perspectivas, pretendemos padronizar o tratamento com ácido ocadáico e  $\beta$ -amilóide para estabelecer um modelo *in vitro* mais característico da DA. Isso possibilitará o uso dessa linhagem para *screening* de drogas com possíveis efeitos neuroprotetores.

**Agradecimentos:** Este projeto foi financiado pelo MCT/CNPq Universal (470306/2011-4), FINEP/IBN-Net (01060842-00), PRONEX/FAPERGS (1000274) and MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7).

### **Referências Bibliográficas:**

- Adalbert R, Gilley J, Coleman M P. 2007. A $\beta$ , tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection. Trends in Mol Med.13.
- Adem A, Mattsson Mek, Nordberg A, Pahlman S. 1987. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. Development Brain Res. 430.
- Agholme, L. Lindström, T. Kågedal, K. Marcusson, J. Hallbeck, M. 2010. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. Journal of Alzheimer's Disease. 20 1069-1082.
- AMERICAN HEALTH ASSISTANCE FOUNDATION. Alzheimer disease research: about Alzheimer, <http://www.ahaf.org/alzheimers/>.
- Arcangeli, A. Rosati, B. Crociani, O. Cherubini, A. Fontana, L. Passani, B. Wanke, E. Olivotto, M. 1999. Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: potentiating effects of BDNF. J. Neurobiol. 40. 214-225.
- Bear, M., Connors, B. e Paradiso, M. 2002. Neurociências: Desvendando o sistema nervoso (2ª Ed.) São Paulo: Artmed Editora.
- Casley C S, Canevari L, Land J M, Clark J B, Sharpe M A. 2002.  $\beta$ -Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzymes activities. J Neurochem. Vol. 80.
- Chao Lp, Wolfgram F. 1971. Spectrophotometric assay for Chole Acetyltransferase. Analytical Biochem. Vol 46.
- Edsjö, A. Lavenius, E. Nilsson, H. Hoehner, J.C. Simonsson, P. Culp, L.A. Martinsson, T. Larsson, C. Pålman, S. 2003.Expression of trkB in human

neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment. *Lab Invest.* Vol. 83, pp. 813-23.

Ellman G L, Courtney D, Andres V J, Featherstone R M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* Vol 7.

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C. Comella, J. X. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J. Neurochem.* Vol.75.

Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. Y. 2004. Neurodegenerative Diseases: A Decade Of Discoveries Paves The Way For Therapeutic Breakthroughs. *Nature Medicine.* Vol 10.

Iwasaki Y, Negishi T, Inoue M, Tashiro T, Tabira T, Kimura N. 2012. Sendai Virus Vector-Mediated Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression Ameliorates Memory Deficits and Synaptic Degeneration in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. of Neuroscience Research.* Vol 90.

Kang, D. E., Roh, S. E., Woo J. A., Liu, T., Bu, J. H., Jung, A.R., Lim, Y. 2011. The interface between Cytoskeletal Aberrations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease and Related Disorders. *Experim Neurobiol.* Vol 20.

Kaplan, D. R., Matsumoto, K., Lucarelli E., Thiele, C. J. 1993. Induction Of Trkb By Retinoic Acid Mediates Biologic Responsiveness To BDNF And Differentiation Of Human Neuroblastoma Cells. *Neuron.* 11.

Karbowski, M., Neutzner, A. 2012. Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathol.*123.

- Lin, M. T., Beal, M. F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. Vol 443.
- Lopes, F. M. Schröder, R., Da Frota Jr, M. L. C., Zanotto-Filho, A. Müller, C. B. Pires, A. S. Meurer, R. T. Colpo, G. D. Gelain, D. P. Kapczinski, F. Moreira, J. C. F. Fernandes, M. C. Klamt, F. 2010. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*. 1337 85 – 94.
- Lopes F M, Londero G F, De Medeiros LM, Motta LL, Behr GA, Oliveira VA, Ibrahim M, Moreira JCF, Porciúncula LO, Rocha, JBT, Klamt F. 2012. Evaluation of the neurotoxic/ neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. *Neurotox res*. 22.
- Nyakas C, Granic I, Halmy Lg, Banerjee P, Luiten Pgm. 2011. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid-beta with memantine. *Behav Brain Res*. 221.
- Oda Y, Nakanishi I. 2000. The distribution of cholinergic neurons in the human central nervous system. *Histol Histopathol*.
- Pagani L, Eckert A. 2011. Amyloid-beta interaction with mitochondria. *Intern J. of Alzheimer's disease*. 2011.
- Pahlman, S. Hoehner, J.C. Nanberg, E. Hedborg, F. Fagerström, S. Gestblom, C. Johansson, I. Larsson, U. Lavenius, E. Örtoft, E. Söderholm, H. 1995. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J. Cancer*, 31a. 453-458.



- Pereira, D. B., Chao, M. V. 2007. The Tyrosine Kinase Fyn Determines the Localization of TrkB Receptors in Lipid Rafts. *The Journal of Neuroscience*. 18, 4859-4869.
- Reddy H. 2011. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Research*. 1415.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L. 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.*, 257.
- Schindowski K, Belarbi K, Buée L. 2008. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes, Brain and Behav*. 7.
- Schliebs R, Arendt T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 113.
- Siegel, G. J. Brady, S.T. Albers, R. W. Price, D. L. 2012. *Basic Neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology*. Oxford: Academic Press, 1096pp.
- Silva, C. M. 2008. Avaliação neuroquímica do sistema colinérgico de camundongos com o gene do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) modificado geneticamente. 202f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- Spuch C, Ortolano S, Navarro C. 2012. New insights in the Amyloid-Beta Interaction with Mitochondria. *J. aging research*. 2012.
- Taylor, J. P., Hardy, J., Fischbeck, K. H. 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*. 296.

Woolf, N.J. 1991. Cholinergic system in mammalian brain and spinal cord. Progress in Neurobiol. 37.

Zampagni, M., Wright, D., Cascella, R., D'adamio, G., Casamenti, F., Evangelisti, E., Cardona, F., Goti, A., Nacmias, B., Sorbi, S., Liguri, G., Cecchi, C. 2012. Novel S-acyl glutathione derivatives prevent amyloid oxidative stress and cholinergic dysfunction in Alzheimer disease models. Free Radical Biol. Med. 52.

Zimmer, E.R., Kalinine, E., Haas C.B., Torrez, V.R., Souza, D.O., Muller A.P., Portela L.V. 2012. Pretreatment with memantine prevents Alzheimer-like alterations induced by intrahippocampal okadaic acid administration in rats. Curr Alzheimer Res.

## Legendas das Figuras

Figura 1: Protocolo de diferenciação nos diferentes grupos utilizados neste trabalho. Grupo 1: As células proliferativas são semeadas e cultivadas em meio suplementado com SFB 10% por 24 horas para completa adesão. Após esse período, foram realizadas análises morfológicas e bioquímicas. Grupo 2: A diferenciação é induzida após adesão celular com a redução do SFB para 1% e a adição de 10 $\mu$ M de AR, sendo este considerado o primeiro dia. Grupo 3: Para a caracterização colinérgica, o BDNF foi adicionado no quarto dia, junto com a reposição de AR. Análises morfológicas e bioquímicas foram realizadas no sétimo dia de diferenciação.

Figura 2: Análise morfológica. A) Imagens representativas de contraste de fase de células SH-SY5Y proliferativas, diferenciadas com AR e co-tratadas com BDNF. Marcação fluorescente por Hoechst evidenciando os núcleos (Aumento de 200X). B) Imagens representativas realizadas através de microscopia eletrônica de varredura de células proliferativas, diferenciadas por sete dias com AR e co-tratadas com BDNF.

Figura 3: Efeitos da diferenciação sobre atividade enzimática de marcadores colinérgicos. A) Cinética medindo a formação de grupamentos de sulfidrilas (-SH) durante atividade da AChE. Atividade da enzima AChE foi determinada medindo-se os níveis de sulfidrilas liberados da degradação de acetilcolina durante dez minutos. Dados apresentados como média  $\pm$  DP para três experimentos independentes realizados em triplicatas. \*\*\* B) Cinética medindo

a formação do conjugado CoA e 4-TP durante 90 minutos. Atividade da ChAT foi determinada após 60 minutos de incubação. Dados apresentados como média  $\pm$  DP para dois experimentos independentes realizados em duplicatas. C) Imagem representativa do imunoconteúdo da enzima ChAT. Análise densitométrica das bandas ponderada por loading control, representando média  $\pm$  DP para dois experimentos independentes. D) Análise de western blot do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Análise densitométrica para um experimento.

Figura 4: Expressão diferencial de genes da sinapse colinérgica e dopaminérgica mediados pelo tratamento com AR e BDNF na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os genes que compõem a Rede de interação gênica da sinapse colinérgica (A) e dopaminérgica (B) avaliados neste estudo e os genes que apresentaram modulação significativa em sua expressão pelo tratamento com AR e BDNF em comparação ao tratamento com AR.

## Neurochemistry International

Fator de Impacto: 2.857

Normas para Submissão:

### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

### **Article structure**

**Please note that Article structure does not apply to reviews.**

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### ***Material and methods***

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### ***Results***

Results should be clear and concise.

#### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including

the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Abstract**

A concise and factual abstract is required. It should not exceed 300 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

## **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

## **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: [http](http://www.iupac-chemistry.org) for further information.

## Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

## Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## Artwork

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

**Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

**Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

**Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**References****Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

**Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

**References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

**Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first



alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

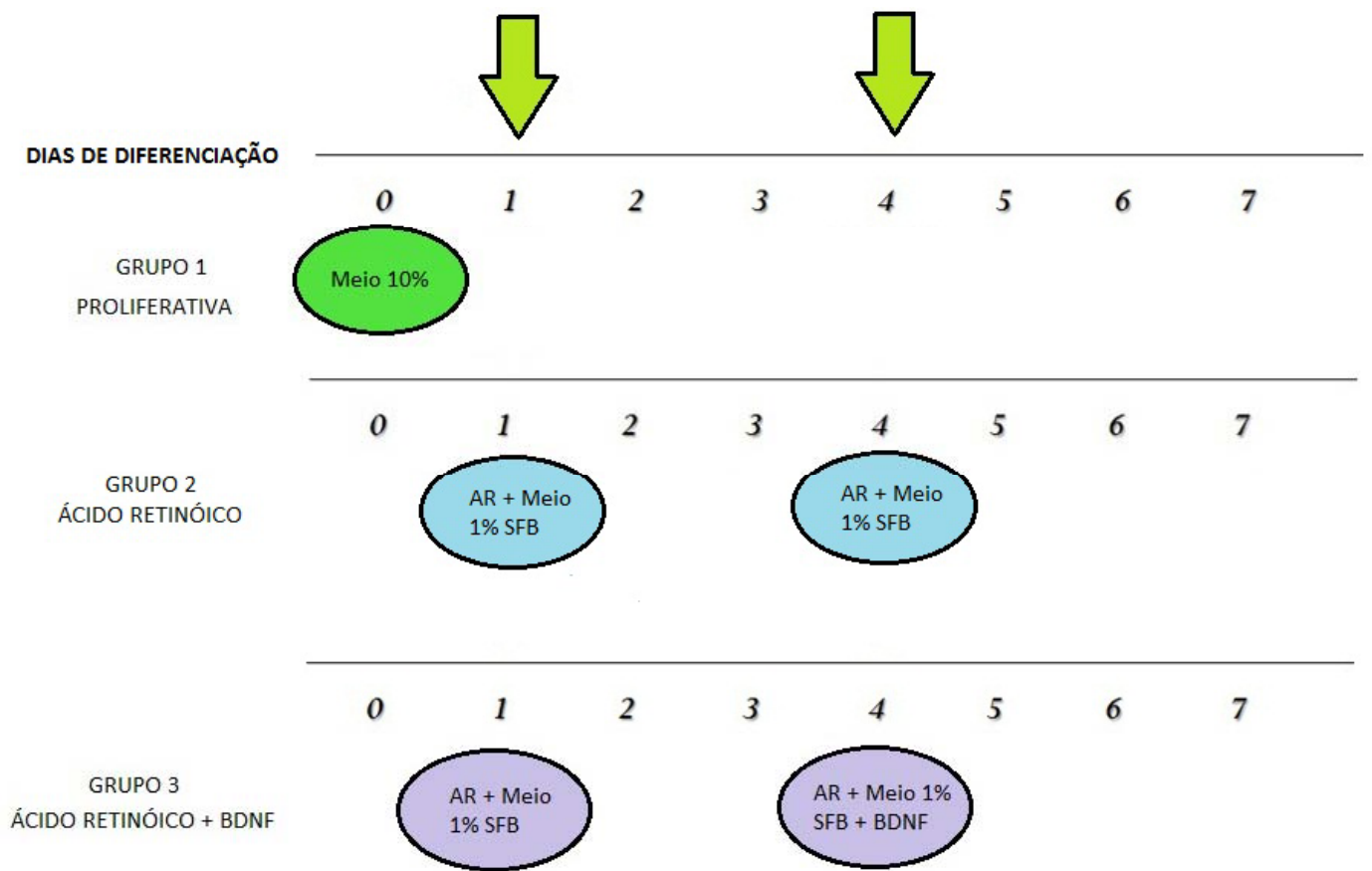
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **Drug names**

*Drug names should be the official or approved names:* trade names or common names may be given in brackets where the drug is first mentioned. The manufacturer's name must be given. The doses of the drugs should be given as unit weight/unit body weight, e.g. mmol/kg or mg/kg. Concentrations should be given in terms of molarity, e.g. nM, or as unit weight/volume solution, stating whether the weight refers to the salt or the active component of the drug. The molecular weight, inclusive of water of crystallization, should be stated if doses are given as unit weight.

The IUB Enzyme Commission (EC) number must be quoted with the full name of the enzyme when it is first mentioned in the text. Subsequently the accepted trivial name should be used, e.g. *Full name:* Acetyl-CoA: choline O-acetyl transferase (EC 2.3.1.6.) *Trivial name:* Choline acetyltransferase not choline acetylase. For this information the author should refer to Enzyme Nomenclature (1973), Elsevier, Amsterdam and the supplement in *Biochim. Biophys. Acta* (1976) **429**, 1-45.



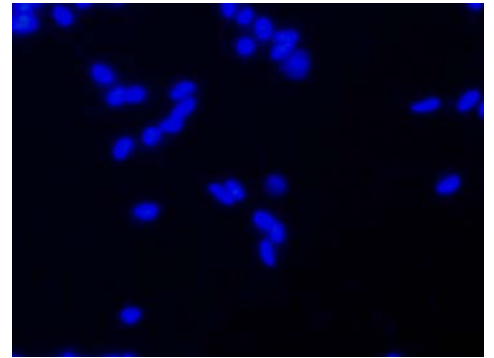
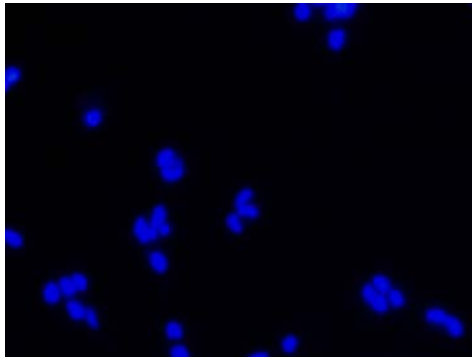
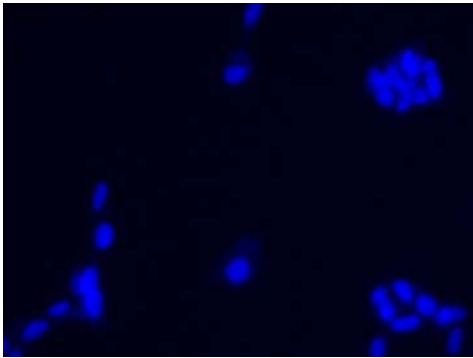
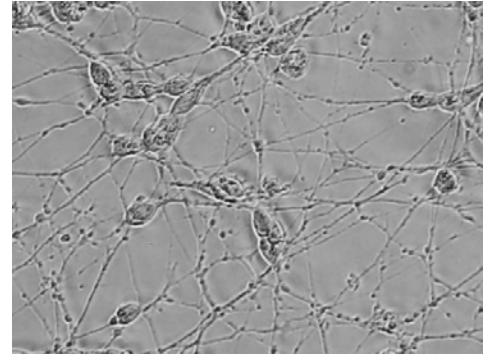
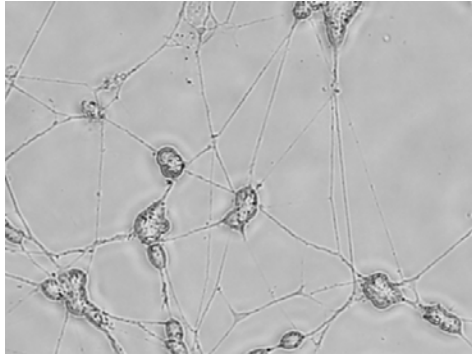
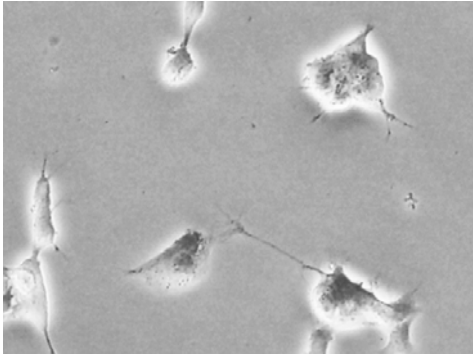
**Figura 1**

A)

Proliferativa

AR

AR + BDNF



B)

Proliferativa

AR

AR + BDNF

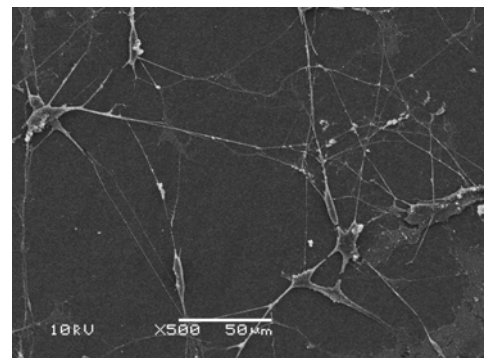
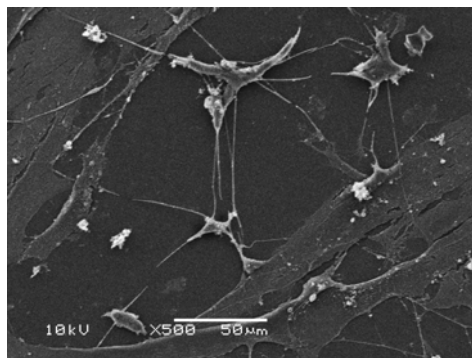
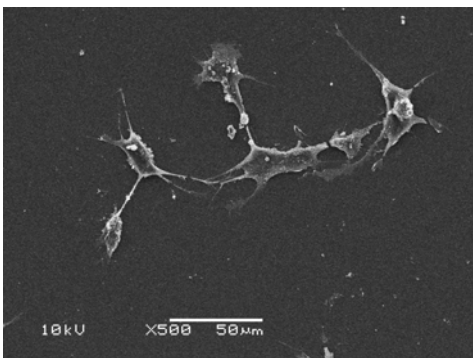
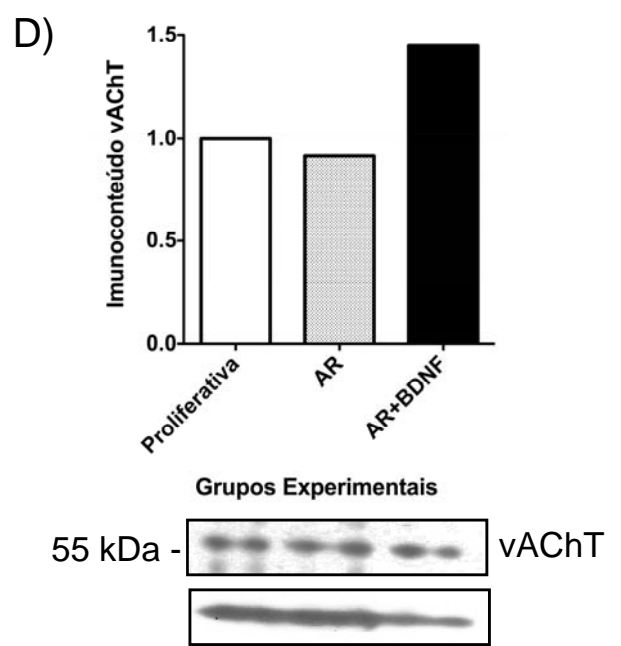
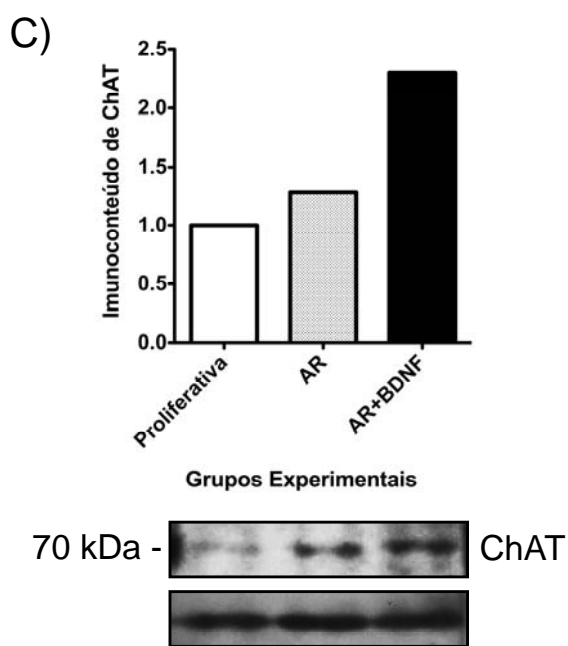
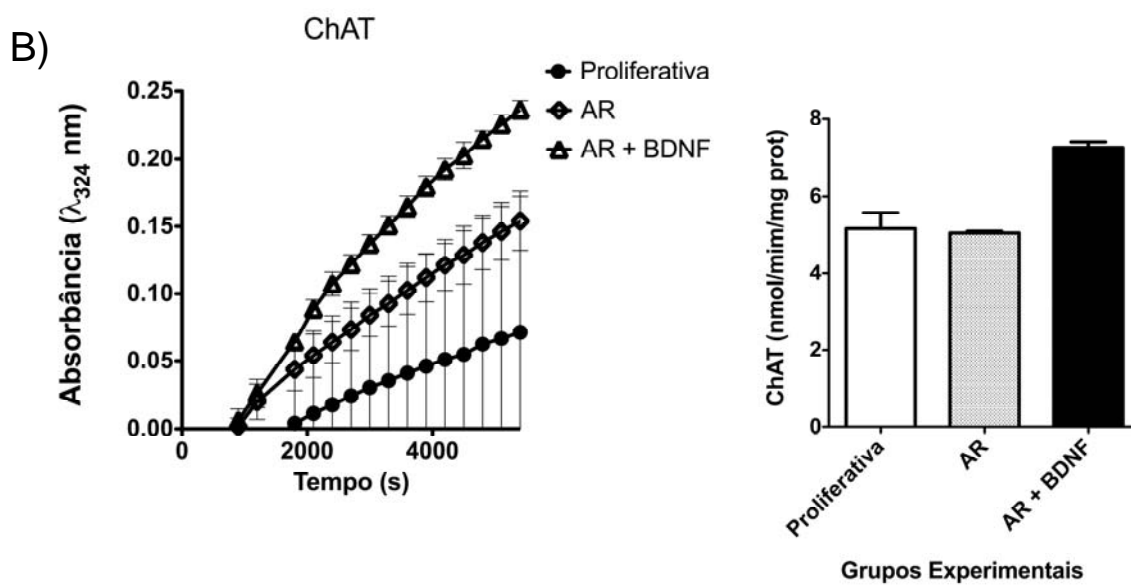
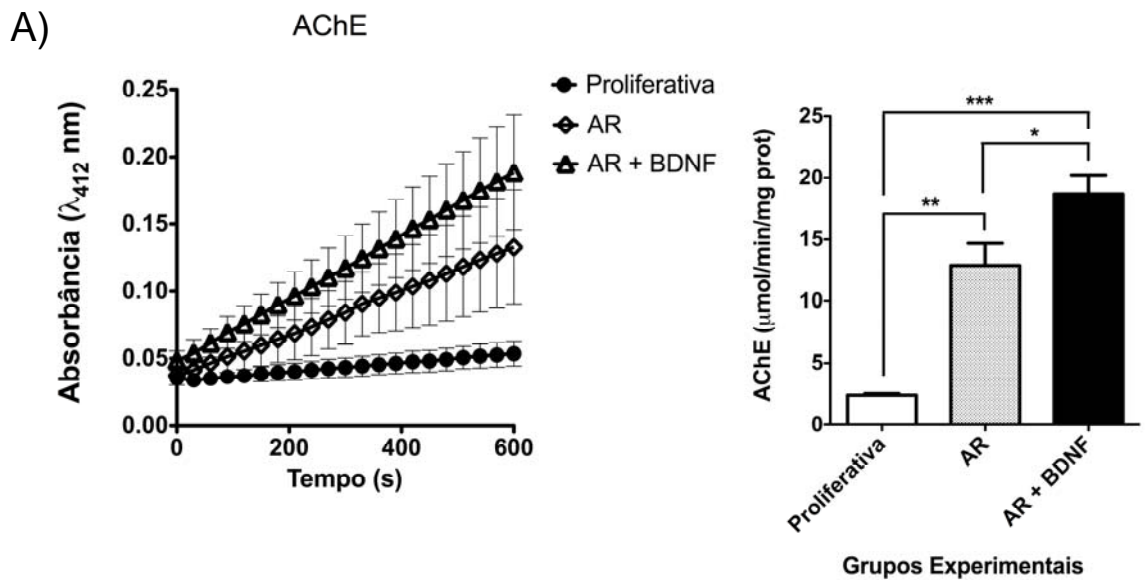


Figura 2



**Figura 3**

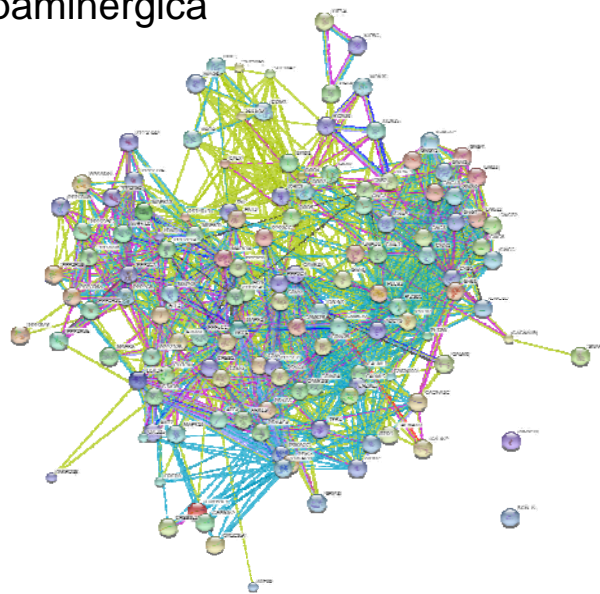
A)

## Sinapse Colinérgica



B)

## Sinapse Dopaminérgica



Lista de genes da sinapse colinérgica com expressão aumentada no grupo AR + BDNF em relação ao grupo AR

Gene	Descrição
ITPR1	receptor inositol 1,4,5-trifosfato , tipo 1
KCNJ2	canal de recaptação de potássio, subfamília J, membro 2
ADCY3	adenilato ciclase 3
GNG5	Proteína G, gama 5
ADCY1	adenilato ciclase 1 (cérebro)
ADCY7	adenilato ciclase 7
PIK3CA	fosfoinositideo-3-cinase, catalítico, alfa polipeptideo
GNG4	Proteína G, gama 4
ATF4	Fator ativador de transcrição 4
ITPR3	receptor inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 3
SLC18A3	Família de carreadores de solutos 18 (acetilcolina vesicular), membro 3
PIK3R2	Fosfoinositideo-3-cinase, subunidade regulatória 2, (p85 beta)
GNB1	Proteína G, polipeptideo beta 1
ADCY5	adenilato ciclase 5
AKT2	oncogene viral de timoma murino homólogo 2 (v-akt) cálcio/calmodulina-dependente proteína cinase (CaM cinase) II beta
CAMK2B	Proteína G, beta 5
GNB5	Proteína G, beta 5
GNAI1	polipeptideo inibidor alfa 1 de proteína G
NRAS	oncogene viral de neuroblastoma homologo RAS (v-ras)
KCNJ3	canal de recaptação de potássio, subfamília J, membro 3
CAMK4	cálcio/calmodulina-dependente proteína cinase (CaM cinase) IV
CHRNA3	Receptor colinérgico, nicotínico, alfa 3
GNAI2	polipeptideo inibidor alfa 2 de proteína G
CHRNA6	Receptor colinérgico, nicotínico, alfa 3
PLCB1	fosfolipase C, beta 1 (fosfoinositidio-especifico)
FYN	oncogene FYN relacionado com SRC, FGR, YES
CHRNA4	Receptor colinérgico, nicotínico, beta 4
GNG3	Proteína G, gama 3

Lista de genes da sinapse dopaminérgica com expressão diminuída no grupo AR + BDNF em relação ao grupo AR

Gene	Descrição
PPP1CB	Proteína fosfatase 1, subunidade catalítica, isoforma beta
MAOB	monoamina oxidase B
PPP2R2C	Proteína fosfatase 2 (2A), rsubunidade regulatória B gama
DRD3	Receptor de dopamina D3
CACNA1A	Canal de cálcio voltagem-dependente, tipo P/Q, subunidade alfa 1A
PPP3CA	Proteína fosfatase 3, subunidade catalítica, isoforma alfa cálcio/calmodulina-dependente proteína cinase (CaM cinase) II gama
CAMK2G	(CaM cinase) II gama
ARRB2	arrestina, beta 2
CREB3L3	Proteína ligadora a elemento responsivo ao cAMP 3-like 3
PPP3CC	Proteína fosfatase 3, subunidade catalítica, isoforma gama
MAPK8	Proteína cinase ativadora de mitose 8
GNAO1	Polipeptideo inibidor alfa O 1 de proteína G
CALM3	calmodulina 3 (fosforilase cinase, delta)
CREB3L2	Proteína ligadora a elemento responsivo ao cAMP 3-like 2
PLCB3	fosfolipase C, beta 3 (fosfatidilinositol-especifica)
PLCB2	fosfolipase C, beta 2
PRKACB	Proteína cinase dependente de cAMP, catalítica, beta aril hidrocarbono receptor nuclear translocador-like nuclear de re
ARNTL	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform
PPP2R2A	