

**Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e Saúde – CCBS
Departamento de Gerontologia – DGero
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia – PPGGero**

Padronização de um método alternativo para diferenciação de células de neuroblastoma utilizando matriz extracelular rica em laminina para avaliação de ADAM10 e IDE em meios de cultivo hiperglicêmico e normoglicêmico

Marina Mantellatto Grigoli

São Carlos/2023

MARINA MANTELLATTO GRIGOLI

**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA UTILIZANDO
MATRIZ EXTRACELULAR RICA EM LAMININA PARA AVALIAÇÃO DE
ADAM10 E IDE EM MEIOS DE CULTIVO HIPERGLICÊMICO E
NORMOGLICÊMICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Gerontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti

SÃO CARLOS/2023

Dedico este trabalho:

A Deus,

Meu suporte, mentor e abrigo
em todos os momentos.

Aos meus pais, Alvanir e Márcia,

Meu maior amor,
exemplo, suporte, incentivo e proteção
vocês são a razão da minha vida

À minha família e amigos,

Meus maiores tesouros e melhores companhias,
obrigada pelo amor, carinho e incentivo.

Aos meus falecidos avós, João Luiz, Olga, Irda e Amido,

As *JOIAS* mais raras e perfeitas que a
terra já teve.

À minha falecida tia Maria Cristina,

Meu maior exemplo de resiliência, força e alegria.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que foram fundamentais em minha jornada durante este período de mestrado, contribuindo de maneira significativa para o alcance deste momento de realização.

À minha amada família e amigos, quero expressar minha eterna gratidão pelo apoio incansável durante todo esse percurso. Especialmente aos meus pais, Márcia e Alvanir, cujo encorajamento constante e suporte inabalável foram a âncora que me sustentou nos momentos desafiadores. Mesmo diante de adversidades e dificuldades, vocês sempre acreditaram em mim e me guiaram com amor. A perda de meu avô João Luiz, minha tia Maria Cristina e minha avó Olga (razão pela qual escolhi estudar especialmente a doença de Alzheimer), durante este período trouxe dor inexprimível, mas suas memórias inspiradoras continuaram a iluminar meu caminho.

Os ensinamento e determinação de meus avós, tanto paternos quanto maternos, moldaram minha busca incessante por conhecimento. A lembrança de meu avô Amido que não tive a chance de conhecer, mas cuja influência é inegável, e minha avó Irda, cuja partida coincidiu com minha escolha pela gerontologia, permanecerão sempre vivas em meu coração. Eles são a chama que me impulsiona a superar desafios e a alcançar alturas que jamais pensei serem possíveis.

Agradeço profundamente minha professora orientadora Dra. Márcia Regina Cominetti e minha coorientadora Dra. Patrícia Regina Manzine, cujo apoio, ensinamentos e confiança foram a bússola que guiou meus estudos. Sem suas orientações, paixões e oportunidades, este marco não teria sido alcançado. Vocês se tornaram não apenas minhas mentoras, mas também partes essenciais de minha jornada.

Aos meus colegas e amigos do LABEN, cada dia compartilhado com vocês foi uma dádiva. Aprendemos juntos, crescemos juntos e enfrentamos desafios juntos. Nossos dias de trabalho moldaram-me tanto pessoal quanto profissionalmente, e sou grata por cada interação e lição compartilhada. Suas experiências e amizade são tesouros que levo comigo.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão, em especial para a Dra. Angelina Maria Fuzer, por toda dedicação e generosidade que demonstrou ao compartilhar suas habilidades e conhecimentos em cultura celular para mim. Sua disposição em me ensinar e guiar com maestria tornou minha jornada de aprendizado significativamente mais enriquecedora. Além disso, sua presença constante, tanto nos momentos desafiadores

quanto nos momentos de alegria, é um verdadeiro presente. Sua energia contagiante e alegria é uma fonte constante de inspiração, tornando não apenas o trabalho, mas também a vida, mais leve e brilhante. Sou extremamente grata por ter você como colega e amiga. Seu impacto positivo em minha vida é realmente inestimável.

Minha jornada também foi enriquecida por amigos e familiares que estiveram ao meu lado ao longo desses anos. A vocês, que ofereceram um ombro amigo nos momentos de dor, trouxeram alívio aos dias difíceis com festas e risadas, e me apoiaram mesmo quando minhas escolhas pareciam impossíveis, meu mais sincero agradecimento. Sua amizade foi um pilar de força e conforto, tornando a jornada mais leve e significativa.

Expresso também, minha gratidão ao Departamento de Gerontologia, ao Programa de Pós-Graduação e à UFSCar, por oferecerem a infraestrutura, experiência e conhecimento que ampliaram meus horizontes. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço também à FAPESP por acreditar em meu projeto e torná-lo possível através do financiamento. Sem essa confiança, minha jornada teria sido muito mais difícil.

Por último, mas não menos importante, dedico esta dissertação às vítimas acometidas pela pandemia da COVID-19. Embora seja agradecida por não ter perdido familiares devidos a essa terrível doença, tive familiares queridos que quase vieram a falecer devido a esse desafio implacável. Que esta dedicatória seja um tributo a todos aqueles que foram afetados por essa crise global, e que nossa busca por conhecimento e soluções possa contribuir para um futuro mais resiliente e unido.

Esta dissertação é o resultado de amor, aprendizado e resiliência. A cada um de vocês, minha família, amigos, professores e colegas, dedico com profunda admiração e carinho. Que este trabalho possa ser uma homenagem às memórias que me inspiram e ao futuro que busco construir em honra de suas contribuições em minha vida.

Muito Obrigada!

“Devemos manter a nossa certeza de que depois dos dias ruins,
os bons virão novamente”

Marie Curie

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa gradual e progressiva caracterizada pela atrofia cortical predominantemente no lobo temporal medial, e microscopicamente, por perdas neuronais extensas e depósitos denominados emaranhados neurofibrilares e placas senis. Desde os resultados do estudo de Rotterdam em 1992, sabe-se que a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) aumenta o risco de demência. Pacientes com DM2 apresentam alterações cerebrais estruturais e comprometimento cognitivo, com elevado risco de desenvolver DA. Estes dados sugerem que a insulina pode desempenhar um papel fundamental com relação a atividade cerebral e com a formação da memória. A partir destes achados, a DA tem sido chamada por alguns pesquisadores de “diabetes tipo 3” (DM3) ou “diabetes cerebral”. Alguns grupos de pesquisa mostraram que a ADAM10, a α -secretase que inibe a formação das placas senis e, portanto, é protetora contra a DA, está alterada no sangue de idosos com esta demência, quando comparado com idosos cognitivamente saudáveis. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi verificar se existem diferenças nos níveis e na atividade de ADAM10 em células de neuroblastoma (SH-SY5Y), diferenciadas e indiferenciadas, cultivadas em meio celular normal e hiperglicêmico, em uma condição que simula o DM2, bem como alterações concomitantes dos níveis de proteínas envolvidas na via insulínica, particularmente da enzima degradadora de insulina (IDE). Os resultados mostraram que a presença da matriz extracelular (MEC) mantém a diferenciação das células neuronais por maior período, mesmo em ambiente com alto teor de glicose. Além disso, também foi possível observar a redução dos níveis de ADAM10 e IDE nas células SH-SY5Y diferenciadas e cultivadas em ambiente hiperglicêmico. Os resultados deste estudo destacam a importância da MEC na manutenção da diferenciação neuronal *in vitro*. Ainda, esses resultados contribuem para uma compreensão mais profunda das interações moleculares entre DM2 e DA e fornecem sugestões valiosas para futuras pesquisas nessas áreas. O impacto desse estudo está relacionado ao melhor entendimento da biologia dessas doenças, evidenciando a necessidade de mais estudos relacionados à implementação de novas abordagens clínicas de tratamento da DA, observando também o estado metabólico dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: doença de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2, células de neuroblastoma, envelhecimento, demência, doenças metabólicas.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a gradual and progressive neurodegenerative disease characterized by cortical atrophy predominantly in the medial temporal lobe and, microscopically, by extensive neuronal losses and deposits called neurofibrillary tangles and senile plaques. Since the results of the Rotterdam study in 1992, it has been known that type 2 diabetes mellitus (T2DM) increases the risk of dementia. Patients with T2DM present structural brain changes and cognitive impairment, with a high risk of developing AD. These data suggest that insulin may play a fundamental role in brain activity and memory formation. Based on these findings, AD has been called "type 3 diabetes" (T3DM) or "cerebral diabetes" by some researchers. Some research groups have shown that ADAM10, the α -secretase that inhibits the formation of senile plaques and, therefore, is protective against AD, is altered in the blood of older adults with this dementia compared to cognitively healthy older adults. In this sense, the objective of this study was to verify whether there are differences in the levels and activity of ADAM10 in neuroblastoma cells (SH-SY5Y), differentiated and undifferentiated, cultured in regular and hyperglycemic cellular media, in a condition that simulates T2DM, as well as concomitant changes in the levels of proteins involved in the insulin pathway, particularly the insulin-degrading enzyme (IDE). The results showed that the extracellular matrix (ECM) maintains the differentiation of neuronal cells for a more extended period, even in an environment with a high glucose content. Furthermore, it was also possible to observe a reduction in ADAM10 and IDE levels in SH-SY5Y cells differentiated and cultured in a hyperglycemic environment. The results of this study highlight the importance of the ECM in maintaining neuronal differentiation *in vitro*. Furthermore, these results contribute to a deeper understanding of the molecular interactions between T2DM and AD and provide valuable suggestions for future research in these areas. The impact of this study is related to a better understanding of the biology of these diseases, highlighting the need for more studies related to the implementation of new clinical approaches to the treatment of AD, also observing the metabolic status of patients.

KEYWORDS: Alzheimer's disease, type 2 diabetes mellitus, neuroblastoma cells, aging, dementia, metabolic diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clivagem da APP pelas α e γ -secretases (via não-amiloidogênica) e pelas β e γ -secretases (via amiloidogênica) com formação do peptídeo A β	17
Figura 2. Sinalização cerebral relacionada à insulina.	22
Figura 3. Interação entre a ativação do receptor de insulina e os marcadores neuropatológicos da doença de Alzheimer.....	23
Figura 4. (A) Conformação em domínios da ADAM10. (B) ADAM10 como ancorada à membrana de plaquetas e neurônios. (C) ADAM10 solúvel como encontrada no plasma e liquor, sem ancoragem à membrana. (D) Arquitetura geral do ectodomínio da ADAM10 humana madura.....	27
Figura 5. Células diferenciadas em dois grupos de células morfologicamente distintos	30
Figura 6. (A) Células SH-SY5Y que não passaram pelo processo de diferenciação celular (B) Células SH-SY5Y que passaram pelo processo de diferenciação celular.....	31
Figura 7. Protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR, sem presença de MEC, cultivadas por 72 h em meio hiperglicêmico.	34
Figura 8. Protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR em coating de Matrigel [®] , cultivadas por 72 h em meio hiperglicêmico.	35
Figura 9. (A) Células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico (B) Representação gráfica do comprimento dos neuritos. (C) Membranas de western blotting (D) Representação gráfica dos níveis de β 3-tubulina	39
Figura 10. (A) Células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico na presença de MEC (B) Representação gráfica do comprimento dos neuritos. (C) Membranas de western blotting. (D) Representação gráfica dos níveis de β 3-tubulina.	41
Figura 11. (A) Células SH-SY5Y não diferenciadas (ND) e diferenciadas com ácido retinóico na ausência (D-AR, 10 μ M de AR) ou presença de Matrigel [®] . (B) O comprimento dos neuritos foi avaliado com auxílio do software ImageJ. (C) Membranas de western blotting. (D) Representação gráfica dos níveis de β 3-tubulina.	44
Figura 12. (A) Estrutura de multidomínios da ADAM10. Os números acima representam a sequência de aminoácidos. (B) Membrana de western blotting (C) Representação gráfica dos níveis de ADAM10.....	47
Figura 13. (A) Membrana de western blotting (B) Representação gráfica dos níveis de ADAM10. (C) Células SH-SY5Y diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico (D-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC (D-MEC-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-AR-H) e diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-MEC-AR-H).	50
Figura 14. (A) Membrana de western blotting. (B) Representação gráfica dos níveis de ADAM10.....	52
Figura 15. (A) Membrana de western blotting. (B) Representação gráfica dos níveis de IDE.	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Ampère
A β – β -amiloide
AGE – Produto final de glicação avançada
AGL – Ácidos graxos livres
APP – Proteína precursora amiloide
APS – Proteína adaptadora com domínio PH e SH2
AR – Ácido retinóico
BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro
BHE – Barreira hematoencefálica
BSA – Albumina de soro fetal bovino
CBL – Proteína proto-oncogênica
CCL – Comprometimento Cognitivo Leve
Cys – Domínio rico em cisteína
Cyto – Domínio citoplasmático
DA – Doença de Alzheimer
DAPI – Diamidino-2-fenilindol
D-AR – Diferenciação com ácido retinóico
D-AR-H – Diferenciação com ácido retinóico e tratamento com meio hiperglicêmico
DDP – Doença de Parkinson
DFT – Demência Frontotemporal
Dis – Domínio desintegrina
DLB – Demência por corpos de Lewy
DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2
DM3 – Diabetes tipo 3
D-MEC-AR – Diferenciação com ácido retinóico na presença de MEC
D-MEC-AR-H - Diferenciação com ácido retinóico na presença de MEC e tratamento com meio hiperglicêmico
DOCK1 – Dedicador de citocinese 1
EGF – Fator de crescimento epidérmico
EHS – *Engelbreth-holm-swan*
FAP – Fração atribuível populacional
FBS – Soro fetal bovino
GLUT1 – Transportador de glicose tipo 1
GLUT3 - Transportador de glicose tipo 3
GLUT4 – Transportador de glicose tipo 4
Grb-2 – Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento
GSIS – Secreção de insulina estimulada por glicose
GSK3 β – Proteína quinase 3 β do glicogênio sintase
IAPP – Polipeptídios amiloides de ilhotas
IDE – Enzima de degradação de insulina
IF – Solução de imunofluorescência
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina
IR – Receptor de insulina
IRS – Substrato do receptor de insulina
IRS1 – Substrato do receptor de insulina 1
IRS2 – Substrato do receptor de insulina 2
IRS4 – Substrato do receptor de insulina 4
JNK – Jun-N-terminal quinase

LCR – Líquido cefalorraquidiano
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos
MEC – Matriz extracelular
ND – Não diferenciadas
NeuN – Antígeno nuclear neuronal
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NGF – Fator de crescimento nervoso
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK – 3-fosfoinositídeo
PI3K – Fofatidilinositol-3-quinase
PIP2 – Fofatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3 – Fofatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB/Akt – Proteína quinase B
Pro – Pró-domínio
PrPSC – Proteína príon
RAGE – Receptor de AGE
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SHC – Proteína transformadora contendo domínio de homologia Src 2
Shc – Proteína codificada pelo gene *shc*
SNC – Sistema nervoso central
TDP43 – Proteína de ligação ao DNA TAR
TGF- β – Fator de crescimento transformador β
TH – Tirosina hidroxilase
TNCL – Transtorno neurocognitivo leve
TNCLa - Transtorno neurocognitivo leve amnésico
Tm – Domínio transmembrana
UCP3 – Proteína de desacoplamento 3
V – Volts
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt – Sítio de integração relacionado ao Wingless

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Envelhecimento e a doença de Alzheimer	13
1.2 Metabolismo da insulina e doença de Alzheimer	17
1.3 Mecanismos moleculares de regulação do receptor de insulina e sua influência nos marcadores neuropatológicos da doença de Alzheimer	19
1.4 Papel e regulação da enzima degradadora de insulina	24
1.5 ADAM10	25
1.6 Células SH-SY5Y para estudos <i>in vitro</i> de doenças neurodegenerativas	28
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Cultura celular	33
3.2 Diferenciação das células SH-SY5Y em meio hiperglicêmico	33
3.3 Preparo do lisado celular	35
3.4 Quantificação de proteínas totais	36
3.5 SDS-PAGE e <i>western blotting</i>	36
3.6 Imunofluorescência	37
3.7 Medição de neuritos e análises estatísticas	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Diferenciação celular	38
4.2 Níveis de ADAM10 na presença de MEC	45
4.3 Níveis da ADAM10 e IDE em células diferenciadas com e sem presença de MEC, cultivadas em meio hiperglicêmico	48
5. CONCLUSÕES	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
7 REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e gradual marcada pela atrofia cortical preeminentemente no lobo temporal medial (Szybińska, Leśniak et al. 2017). Em nível microscópico a DA é caracterizada por perdas neuronais extensas e predominante depósito de emaranhados neurofibrilares e placas senis, intra e extracelular, respectivamente (Kumar, Sidhu et al. 2018). A partir do estudo de Rotterdam em 1992, sabe-se que a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um fator de risco para o desenvolvimento de quadros demenciais, entre eles a DA (de Bruijn, Bos et al. 2015). Desse modo, pessoas que apresentam tais alterações nas estruturas cerebrais e funcionais, além do comprometimento cognitivo, possuem maior risco para desenvolver a DA (Szybińska, Leśniak et al. 2017). Assim, esses dados sugerem que a insulina, um hormônio atuante na DM2, desempenha um papel fundamental na atividade cerebral e conseqüentemente na formação de memórias (McNay and Pearson-Leary 2020). Devido a isso, alguns pesquisadores têm se referido à DA como “diabetes cerebral” ou “diabetes tipo 3” (Szybińska, Leśniak et al. 2017).

Ademais, a população brasileira vem assumindo uma configuração mais envelhecida a cada ano devido às quedas das taxas de fecundidade e mortalidade no país. Esse novo perfil demográfico leva ao aumento das doenças crônico-degenerativas, que passam a ocupar destaque como principais causas de mortalidade e morbidade (Szybińska, Leśniak et al. 2017). Além das doenças crônico-degenerativas, a queixa de perda de memória e outros déficits cognitivos passam a ser mais recorrentes diante de uma população mais envelhecida (Szybińska, Leśniak et al. 2017). Desse modo se faz necessário ampliar conhecimento a respeito dessas doenças, em especial, das relações entre elas, visando a formulação de novas estratégias que possam atuar na prevenção, no diagnóstico e no tratamento da DA.

1.1 Envelhecimento e a doença de Alzheimer

O envelhecimento populacional brasileiro vem assumindo grande destaque nas temáticas referentes à saúde pública. Os principais fatores dessa aceleração na transição demográfica no Brasil são a expressiva redução na taxa de fecundidade, concatenada à forte diminuição da taxa de mortalidade e o aumento significativo da expectativa de vida (Cidades 2018). Desse modo, o Brasil caminha aceleradamente para um perfil demográfico mais envelhecido, o que caracteriza uma transição epidemiológica, em que doenças crônico-degenerativas conquistam lugar de destaque e passam a representar as principais causas de mortalidade e morbidade (Cidades 2018).

Assim, com a população idosa crescendo em ritmo acelerado, as projeções indicam um aumento exponencial de indivíduos acometidos por esses tipos de demências a cada duas décadas. Estima-se que até 2040 esse número atinja a expressiva marca de 81,1 milhões, destacando as demências como um dos principais desafios no âmbito de saúde pública (Livingston, Sommerlad et al. 2017). Assim, a atual prevalência de distúrbios demenciais na América Latina é de cerca de 8,5% da população total, em consonância com resultados observados em diversos estudos internacionais (Custodio, Wheelock et al. 2017).

Múltiplos elementos de predisposição estão relacionados a DA, incluindo, mas não somente se limitando ao avanço da idade, histórico de lesões cerebrais traumáticas, quadros depressivos, enfermidades cardiovasculares e cerebrovasculares, tabagismo, antecedentes familiares de demência e a presença do alelo APOE ϵ 4 (Kumar and Tsao 2018). Um estudo publicado na revista Lancet em 2017 apresentou nove fatores de risco potencialmente reversíveis para demência. Esses fatores são divididos entre aqueles que ocorrem no início da vida como baixos níveis educacionais; na meia vida, como perda auditiva, hipertensão e obesidade; ou nos anos finais da vida, como tabagismo, depressão, inatividade física, isolamento social e diabetes (Livingston, Sommerlad et al. 2017).

Em uma atualização do estudo de 2017 foram incorporados outros três novos fatores de risco modificáveis para demência: o consumo excessivo de álcool, lesões cerebrais traumáticas e poluição do ar (Livingston, Huntley et al. 2020). Ao realizar novas revisões e meta-análises, esses fatores foram incorporados a um modelo revisado, totalizando assim 12 fatores de risco para a prevenção da demência ao longo da vida. Em conjunto, esses fatores de risco são responsáveis por aproximadamente 40% dos casos de demência em todo o mundo, sugerindo que uma diminuição significativa da doença poderia ser alcançada ao prevenir esses fatores reversíveis (Livingston, Huntley et al. 2020).

É importante destacar que o potencial de prevenção é particularmente relevante e significativo em países de baixa e média renda, como o Brasil, onde a incidência de demências é mais expressiva (Livingston, Huntley et al. 2020, Suemoto, Mukadam et al. 2023). No contexto brasileiro, esses 12 fatores de risco são responsáveis por 48% dos casos de demência em diferentes regiões do país (Suemoto, Mukadam et al. 2023), mostrando que os dados são diferentes daqueles encontrados em países de alta renda. Ao estratificar essas estimativas por raça e nível socioeconômico no Brasil, torna-se evidente que o potencial de prevenção da demência no país é substancialmente maior do que em nações de alta renda. Nesse contexto, ações prioritárias de prevenção devem focar

especificamente em áreas como a educação, controle da hipertensão e prevenção da perda auditiva (Suemoto, Mukadam et al. 2023).

Ao longo do processo de envelhecimento, é possível observar que queixas relacionadas à perda de memória podem surgir, muitas vezes acompanhadas de dificuldades no desempenho de outras funções cognitivas. Essas dificuldades, embora perceptíveis, não costumam atingir um ponto que caracterize uma síndrome demencial (Weller and Budson 2018, Vatanabe 2020). Em 1999, Petersen introduziu o conceito de Comprometimento Cognitivo Leve (CCL), que posteriormente foi atualizado para Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL) de acordo com o DSM-V (Petersen, Smith et al. 1999). Os critérios clínicos que definem o TNCL compreendem a identificação de um declínio cognitivo moderado em comparação com o nível de funcionamento anterior em um ou mais domínios cognitivos, além de um desempenho neurocognitivo reduzido em testes formais ou avaliações clínicas equivalentes, com uma margem de um a dois desvios padrão abaixo do esperado. Adicionalmente, é necessário que as mudanças cognitivas não interfiram na autonomia do indivíduo, mesmo que ocasionalmente demandem esforços e estratégias de compensação (Petersen, Smith et al. 1999). Estudos mostram que o subtipo amnésico do TNCL (TNCLa) pode representar uma fase pré-demencial sintomática associada à DA, uma vez que esse subtipo ocorre quando o domínio cognitivo de memória é comprometido, principalmente a memória episódica (Petersen and Morris 2005, Albert, DeKosky et al. 2011).

Atualmente, a DA é a demência que ocupa uma posição de destaque não apenas no Brasil, mas também em âmbito global. Ainda que predomine como o tipo de demência mais prevalente, não se pode ignorar as outras formas de manifestação demencial essenciais para se chegar a um diagnóstico diferencial sólido, como a demência da doença de Parkinson (DDP), demência frontotemporal (DFT) e demência como corpos de Lewy (DLB). Essas doenças são categorizadas no sistema nervoso central (SNC) pela presença de proteinopatias, incluindo agregações anormais de peptídeo β -amiloide ($A\beta$), proteína príon (PrPSc), tau, α -sinucleína (α -syn), *TAR DNA-binding protein 43* (TDP43) ou da proteína FUS (Manzine, Vatanabe et al. 2022). Igualmente importante para o diagnóstico diferencial também são os casos clínicos de distúrbios transitórios, enquanto condições reversíveis, devido a progressão de infecções, déficit de vitamina B12, hipotireoidismo e hidrocefalia de pressão normal, os quais podem imitar quadros de demência com a presença de sintomas psiquiátricos, que podem ser tratados com intervenções medicamentosas adequadas revertendo o quadro (Quevedo 2019).

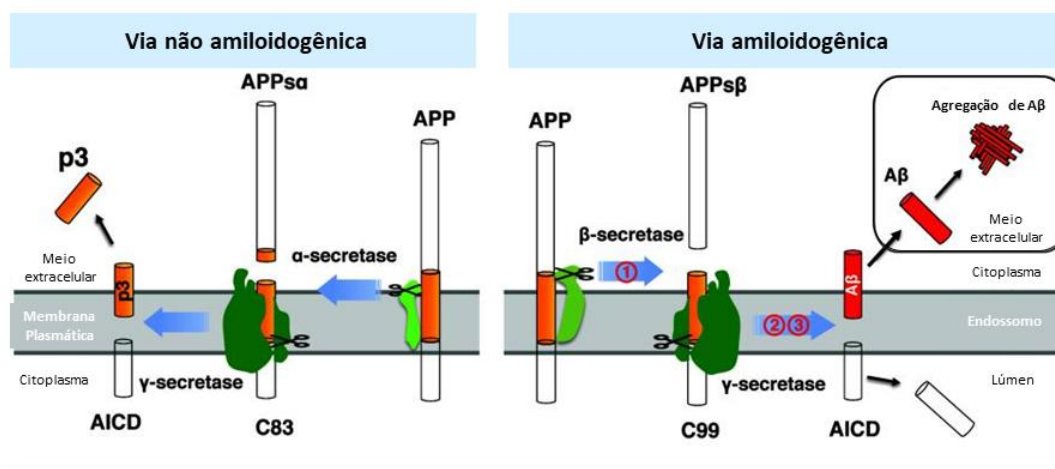
A demência associada à DA se caracteriza por uma síndrome clínica que envolve o desenvolvimento de déficits cognitivos suficientes para impactar a funcionalidade social e ocupacional diária do indivíduo (Qiu and Fratiglioni 2018). Conforme definido pelo DSM-V, a DA é categorizada como um “Transtorno Neurocognitivo Maior”, para cujo diagnóstico é necessário que dois ou mais desvios padrão abaixo da média esperada para a idade sejam observados nos testes cognitivos, com as alterações cognitivas sendo substanciais o bastante para prejudicar a autonomia do indivíduo (Kumar, Sidhu et al. 2018).

Na DA, os emaranhados neurofibrilares encontrados em nível microscópico formam-se pela dissociação da proteína tau dos microtúbulos. A tau tem a função de manter a estrutura e a funcionalidade do citoesqueleto dos axônios neuronais. No entanto, na DA, essa proteína passa por um processo de hiperfosforilação, levando à desconexão dos microtúbulos neuronais e subsequente agregação em emaranhados intraneuronais, culminando no colapso da estrutura neuronal. Esse fenômeno tem início no hipocampo e posteriormente se estende por todo córtex cerebral (Kumar and Tsao 2018).

Por outro lado, as placas amiloides emergem devido ao excessivo depósito do A β no cérebro. O A β é derivado da clivagem da proteína precursora de amiloide (APP) mediante a ação das proteases β e γ -secretases (Figura 1). A clivagem sequencial, primeiramente por β e depois pela γ -secretases resulta em peptídeos de 40 e 42 aminoácidos. Notavelmente, o A β 42, devido à hidrofobicidade aumentada, demonstra uma maior tendência à agregação, o que desencadeia toxicidade neuronal por acumulação. A deposição amiloide também ocorre em torno dos vasos meníngeos e cerebrais, caracterizando um dos aspectos da DA (Kumar and Tsao 2018).

Apesar das evidências genéticas e neuroquímicas sustentarem as premissas apresentadas, é importante destacar que a patogênese da DA é muito mais intrincada, abrangendo diversos outros mecanismos, tais como um intenso processo inflamatório, acompanhado de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, entre outros (Manzine, Vatanabe et al. 2020).

Figura 1. Clivagem da APP pelas α e γ -secretases (via não-amiloidogênica) e pelas β e γ -secretases (via amiloidogênica) com formação do peptídeo A β . Extraído e modificado de (Zhao, Liu et al. 2020).



1.2 Metabolismo da insulina e doença de Alzheimer

O processo de envelhecimento está intricadamente ligado ao aumento das condições metabólicas adversas, abarcando a obesidade, a resistência sistêmica à insulina, a síndrome metabólica e a DM2 (Breteler, van den Ouweland et al. 1992). Paralelamente, as modificações na via da insulina têm sido associadas a distúrbios cerebrais, incluindo a DA (De Felice and Lourenco 2015). A ligação entre a DM2 e os quadros demenciais foi primeiramente demonstrada no estudo de Rotterdam, que delineou o agravamento do risco para o desenvolvimento de demência entre pessoas com DM2 (Breteler, van den Ouweland et al. 1992). De acordo com a literatura, indivíduos com DM2 apresentam alterações cerebrais e declínio cognitivo notório, ampliando notavelmente o risco para o surgimento da DA, especialmente em sua manifestação de início tardio (Hayden 2019).

A partir do estudo de Rotterdam foi possível encontrar características compartilhadas entre ambas as enfermidades, DA e DM2, tais como disfunções na via de sinalização da insulina, processamento atípico de proteínas, aumento do estresse oxidativo, desregulação no metabolismo da glicose, ativação de rotas inflamatórias e formação de produtos finais da glicação avançada (*advanced glycation end-product* - AGE) (Sims-Robinson, Kim et al. 2010). Além disso, também se revelou uma possível conexão entre a comprometida sinalização da insulina e as modificações na proteína tau (de Quadros and Batista 2019).

Os elementos inflamatórios decorrentes da DM2, incluindo ácidos graxos livres (AGL) e lipídeos em geral, ativam uma cadeia inflamatória, desencadeando a liberação de citocinas que colaboram com a instauração da inflamação, tais como as interleucinas

(De Felice and Lourenco 2015). Em decorrência disso, a presença elevada de AGL desencadeia o processo de neuroinflamação, podendo interferir na ação antiproteolítica da insulina e, conseqüentemente, intensificar a liberação de AGL na corrente sanguínea (Ferreira, Fernandes et al. 2018, da Silva Santos, Senhorinha et al. 2021).

Os AGE compartilham um mecanismo comum na DA e DM2, já que resultam de reações inespecíficas entre açúcares e lipídios ou proteínas, sendo a hiperglicemia a responsável por sua formação (Ferreira, Fernandes et al. 2018). É importante enfatizar que o receptor de AGE (RAGE) também pode funcionar como um possível receptor para o peptídeo A β , colaborando para a hiperfosforilação da proteína tau e, como consequência, para a formação dos emaranhados neurofibrilares, aumento na produção de A β e diminuição das sinapses (Ferreira, Fernandes et al. 2018). Como resultado, a formação dos AGE pode levar ao comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE) através da interação entre RAGE e A β , de maneira similar às anomalias causadas pelo dano neural da DA (Ferreira, Fernandes et al. 2018).

Mudanças na permeabilidade da BHE resultam na entrada de AGL no cérebro, desencadeando a subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias. Esse aumento nos níveis de AGL no cérebro torna-o suscetível à ativação de receptores de padrões reconhecidos, bem como a processos inflamatórios e estresse do retículo endoplasmático (Ferreira, Fernandes et al. 2018)

A degradação da BHE desencadeia um estado de neuroinflamação devido à ativação da micróglia (Gomes 2015). Na presença de hiperglicemia, um ciclo de retroalimentação positiva (*feedback*) emerge, com a intensificação dos níveis de produtos de AGE que se ligam aos RAGE, resultando em um aumento subsequente nas placas amiloides e emaranhados neurofibrilares. Essas alterações por sua vez, contribuem para a amplificação da neuroinflamação e das lesões na BHE (Ferreira, Fernandes et al. 2018). Esse cenário é influenciado pelas citocinas pró-inflamatórias, que atuam como mediadoras dessa inflamação e resultam em disfunção sináptica e resistência neuronal à insulina (Ferreira, Fernandes et al. 2018).

Embora o cérebro já tenha sido considerado um órgão insensível à insulina as informações presentes na literatura mostram que esse hormônio possui a capacidade de regular a sobrevivência, a função e a plasticidade neuronal, bem como agir como um fator de crescimento neuronal (Biessels and Reagan 2015). No tecido cerebral, a interação entre a insulina e seu receptor (IR) desencadeia a ativação de vias de sinalização que, por sua vez, resultam em efeitos neuroprotetores (Silva 2016). Em algumas regiões cerebrais, como o hipocampo, hipotálamo, bulbo olfativo, hipófise, córtex e substância negra, os

níveis de insulina podem ser de 10 a 100 vezes mais elevados do que no plasma (Bedse, Di Domenico et al. 2015). Ademais, o hipocampo é a região chave nos processos de memória e aprendizado, apresentando altos níveis de receptores de insulina, e portanto, representa um importante alvo para tal hormônio (Bedse, Di Domenico et al. 2015).

Estes dados sugerem que a insulina pode executar um papel importante nos mecanismos relacionados à atividade cerebral e, estritamente, com a formação de memória. Dessa maneira, a partir destes achados, a DA tem sido nominada por alguns pesquisadores de “diabetes tipo 3” (DM3) ou “diabetes cerebral” (Formiga and Perez-Maraver 2014).

1.3 Mecanismos moleculares de regulação do receptor de insulina e sua influência nos marcadores neuropatológicos da doença de Alzheimer

Em contextos fisiológicos normais as células β -pancreáticas desempenham papel central na síntese de insulina. Após ser liberada na corrente sanguínea, a insulina percorre um trajeto até o tecido cerebral, cruzando a BHE. Uma vez no cérebro, ela se liga aos seus receptores específicos (IR), que estão predominantemente situados no hipocampo, conforme já mencionado no texto (Frölich, Blum-Degen et al. 1999, Folch, Ettcheto et al. 2018).

O IR é uma glicoproteína formada por uma subunidade α extracelular com massa molecular de 135kDa, e por uma subunidade β transmembrana de 95kDa (Hoyer 2004, Maurer and Hoyer 2006). Essa molécula pertence à família dos substratos do receptor de insulina (IRS) e desempenha um papel crucial nas vias de sinalização a ela associadas (Hoyer 2004, Maurer and Hoyer 2006).

Sob circunstâncias fisiológicas, a interação entre a insulina e a subunidade α resulta na formação de um dímero do IR originando o complexo $\alpha 2\beta 2$ na membrana celular. Este evento desencadeia a autofosforilação da subunidade β em três resíduos de tirosina específicos: Tyr1158, Tyr1162 e Tyr1163. Este é o primeiro passo no processo de ativação do IR (Folch, Ettcheto et al. 2018). Uma vez ativados, os IR se agrupam e fosforilam diversos substratos localizados na membrana plasmática. Esses substratos incluem o IRS1-2 (substrato receptor de insulina 1 e 2), SHC (Proteína transformadora contendo domínio de homologia Src 2), Grb-2 (Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento), DOCK1 (Dedicador de citocinese 1), CBL (Linfoma de linhagem B de Casitas) e APS (Proteína adaptadora com domínio PH e SH2), os quais possuem sítios de ligação específicos para recrutar outras proteínas na via de sinalização da insulina (Zhao, Chen et al. 1999).

A insulina exerce seus efeitos no cérebro principalmente através de duas vias distintas: a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/Akt) e a via Ras/proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), que estão envolvidas nas atividades proliferativas e metabólicas, respectivamente. Os resíduos de tirosina fosforilados do IR interagem com os substratos do receptor de insulina IRS-1 e 2, ativando a via da PI3K (Yarchoan, Toledo et al. 2014). A ação de PI3K resulta na conversão do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Esse processo, por sua vez, ativa a proteína quinase B (PKB/Akt) com a assistência da quinase dependente de 3-fosfoinositídeo (PDK) (Yarchoan, Toledo et al. 2014). A presença de PIP3 recruta Akt para a membrana plasmática, onde ela é fosforilada pela proteína quinase dependente de 3-fosfoinositídeo (PDK1). Essa forma fosforilada da Akt então promove a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática de neurônios na região do hipocampo. Essa translocação possibilita a metabolização adequada da glicose no cérebro (Folch, Ettcheto et al. 2018). Vale ressaltar que a estimulação da via Akt/PKB também é capaz de fosforilar outras proteínas quinases que atuam nas serinas e treoninas dos receptores de insulina, proporcionando um mecanismo de *feedback* inibitório quando necessário (Wu, Wang et al. 2010).

Um alvo crucial da via PI3K/Akt é a enzima glicogênio sintase quinase (GSK3 β), que possui duas isoformas, α e β . A Akt fosforila a GSK3 β , inativando-a, em um processo regulado positivamente pela sinalização da insulina. Na forma não fosforilada (ativa), a GSK3 β tem vários alvos, incluindo a proteína tau e a APP. A GSK3 β aumenta a fosforilação da tau, reduzindo sua ligação aos microtúbulos. A GSK3 α também aumenta a produção do A β , pois estimula a atividade da β -secretase BACE1. Além disso, a ativação da GSK3 β está envolvida na promoção da depressão de longo prazo ou no enfraquecimento da força sináptica, possivelmente por meio da ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) ou da endocitose dos receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico (AMPA). A potencialização a longo prazo, por outro lado, ativa a GSK3 β por meio de um mecanismo dependente de PI3K/Akt. Estes processos desempenham um papel crucial na compreensão dos efeitos da insulina no cérebro (Chami, Steel et al. 2016).

Os IR também desempenham um papel crítico na modulação da via de sinalização da MAPK, que desempenha um papel vital na manutenção da sobrevivência neuronal. Essa via inclui uma série de quinases sensíveis a estímulos externos, tais como as quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK1, ERK2), p38 e c-Jun-N-terminal quinase (JNK). A JNK tem sido reconhecida como uma peça fundamental da regulação das

respostas fisiológicas ao estresse oxidativo e inflamatório, dois processos intrinsecamente relacionados à patogênese da DA (Culbert, Skaper et al. 2006, Ando, Uemura et al. 2011, Schnöder, Hao et al. 2016).

Em paralelo, além de GLUT4, a glicose também é transportada para o tecido cerebral por meio do transportador de glicose tipo 1 (GLUT1), presente nas células endoteliais da barreira hematoencefálica. Além disso, astrócitos também expressam GLUT1, enquanto neurônios capturam glicose diretamente do tecido cerebral por meio de transportador de glicose tipo 3 (GLUT3) ou, alternativamente, contam com o lactato (Chami, Steel et al. 2016).

Os astrócitos desempenham um papel crucial na estrutura e função das sinapses e da barreira hematoencefálica, possibilitando a progressão do fluxo sanguíneo cerebral com a atividade neuronal, uma evidência conhecida como cobertura neurovascular (Chami, Steel et al. 2016). Os astrócitos também atuam na remoção do neurotransmissor glutamato das sinapses excitatórias, convertendo-o em glutamina antes de devolvê-lo aos neurônios, utilizando o transportador glial de glutamato, GLAST1 (Chami, Steel et al. 2016).

A figura 2 sintetiza os passos da via de sinalização de insulina em nível cerebral, mostrando que os neurônios podem metabolizar a glicose diretamente, mas é possível que os astrócitos também possam aumentar o suprimento de energia neuronal por conversão de glicose em lactato através do metabolismo anaeróbico exportando-o para o interstício, onde os neurônios podem captá-lo (Kann and Kovacs 2007).

Os IR exercem um controle sobre os processos ligados à apoptose, autofagia, estresse oxidativo e viabilidade celular. Pessoas com DA demonstram níveis diminuídos de IR (Hoyer 2002, Hoyer 2004), bem como uma redução dos níveis de insulina e do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) em regiões cerebrais como o córtex frontal, hipotálamo e hipocampo (Jafferli, Dumont et al. 2000).

Os processos bioquímicos associados à neurodegeneração em camundongos que não expressam o receptor de insulina cerebral (NIRKO) demonstraram uma diminuição na atividade de Akt. (Schubert, Gautam et al. 2004). Esses resultados destacam de que forma alterações na via de sinalização insulínica no cérebro podem contribuir para a formação de marcadores característicos da DA e demonstram como a resistência à insulina neuronal pode potencialmente predispor a essa condição.

1.4 Papel e regulação da enzima degradadora de insulina

A enzima degradadora de insulina (IDE) é uma metalo-endopeptidase altamente preservada e amplamente expressa, pertencente à superfamília de metaloproteases de Zinco denominadas “inverzincinas”. A IDE e seus homólogos são altamente conservados e encontrados em uma variedade de organismos, desde vírus até humanos. Essas enzimas se destacam por apresentarem uma sequência de ligação ao zinco invertida (HxxEH), em contraste com a maioria das metaloproteases convencionais (HExxH). A IDE tem como função principal a degradação da insulina, bem como de vários outros peptídeos de tamanho intermediário (González-Casimiro, Merino et al. 2021). Embora tenha sido amplamente assumido que a IDE desempenha um papel central na depuração hepática da insulina, evidências recentes têm mostrado que ela possui diversas funções fisiológicas adicionais de grande relevância para a manutenção da homeostase da glicose e da insulina, incluindo a regulação da secreção de insulina pelas células β do pâncreas (González-Casimiro, Merino et al. 2021).

Embora as células β -pancreáticas e sua disfunção na DM2 sejam extensivamente estudadas, ainda não é compreendido completamente seu funcionamento defeituoso na doença. Diversos mecanismos patogênicos já foram propostos, incluindo morte celular, desdiferenciação, transdiferenciação e perda de identidade celular. Além disso, a IDE tem sido ligada à DM2 em estudos de associação genômica, identificando variações genéticas no locus *Hhex/Idc* relacionadas à incidência da doença, secreção de insulina e resposta à glicose das células β -pancreáticas (González-Casimiro, Merino et al. 2021). No entanto, até recentemente o papel da IDE nas células β -pancreáticas permaneceu desconhecido em sua maior parte. Em 2018, foi demonstrado que a IDE é expressa em níveis significativamente mais altos em células α em comparação com as células β -pancreáticas e outros tipos celulares das ilhotas pancreáticas. Isso sugere a relevância de se investigar o papel da IDE nas células produtoras de glucagon (Kurochkin and Goto 1994, González-Casimiro, Merino et al. 2021). Além disso, a IDE pode ter um papel na disfunção das células β associadas à DM2, embora haja resultados contraditórios na literatura. Essa contradição pode refletir a multifuncionalidade da IDE em diferentes tecidos e tipos celulares (González-Casimiro, Merino et al. 2021).

Em relação as células β -pancreáticas foi observado que os níveis de IDE estão diminuídos em indivíduos com DM2. Ainda, foi observado que os níveis de IDE podem variar em pacientes com DM2 dependendo do tratamento recebido (Kurochkin and Goto 1994, González-Casimiro, Merino et al. 2021). A exposição à insulina parece aumentar os níveis de IDE nas células β -pancreáticas, sugerindo um mecanismo adaptativo para

eliminar o excesso de insulina e restaurar a homeostase. Essas descobertas destacam a plasticidade de expressão da IDE nas células β -pancreáticas em resposta a diferentes ambientes metabólicos e hormonais, visando preservar a função dessas células (González-Casimiro, Merino et al. 2021).

Além de sua capacidade de degradar a insulina, a IDE também é conhecida por degradar outros substratos incluindo o peptídeo A β , glucagon, somatostatina, amilina, APP, entre outros (González-Casimiro, Merino et al. 2021). Assim, a IDE, como uma protease envolvida no processamento do A β poderia representar um alvo potencial para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos para a doença (Kurochkin and Goto 1994, González-Casimiro, Merino et al. 2021). A partir disso, foi observado que a IDE poderia ser uma candidata promissora como protease intracelular com papel de degradação do A β , uma vez que a IDE é uma protease altamente seletiva que normalmente degrada hormônios peptídicos, embora sua especificidade não esteja restrita a nenhum resíduo de aminoácido em particular (Kurochkin and Goto 1994). Sugere-se então, que sua seletividade esteja relacionada ao reconhecimento de características secundárias específicas nas estruturas dos substratos, em vez de ligações peptídicas específicas (Kurochkin and Goto 1994). Notavelmente, mesmo que os substratos da IDE, como a insulina e o A β , apresentem estruturas primárias muito distintas, eles compartilham um possível motivo estrutural comum que os torna propensos a formar fibrilas amiloides em certas condições, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kurochkin and Goto 1994).

As fibrilas amiloides consistem em diferentes proteínas organizadas em uma conformação cruzada, sugerindo que a especificidade da IDE pode basear-se no reconhecimento de estruturas em conformação β presentes na superfície dos substratos ou adotadas após a ligação à protease. Isso explicaria o fato da IDE estar envolvida na degradação do A β (Kurochkin and Goto 1994, González-Casimiro, Merino et al. 2021). Portanto, a IDE desempenha um papel crítico tanto na regulação da insulina quanto na diminuição do acúmulo do A β no cérebro. A sua disfunção tem o potencial de contribuir para a resistência à insulina no DM2 e elevar o risco para DA. Compreender o mecanismo de ação da IDE é de fundamental importância para abordar essas condições de saúde complexas e poder fornecer bases para estratégias diagnósticas e terapêuticas futuras.

1.5 ADAM10

A ADAM10 é uma metaloprotease caracterizada como a principal α -secretase neuronal diretamente envolvida na DA, realizando a clivagem não-amiloidogênica da

APP (Peron, Vatanabe et al. 2018). A ADAM10 é uma proteína de membrana constituída por aproximadamente 750 aminoácidos e pode clivar mais de 30 tipos de proteínas de membrana, além da APP (Hooper and Turner 2002, Peron, Vatanabe et al. 2018). Esta metaloprotease possui diferentes domínios, como o transmembrana, o rico em cisteína, o domínio desintegrina, o domínio metaloprotease e o pró-domínio (Figura 4). A ADAM10 é sintetizada como um zimogênio inativo no complexo de Golgi. Ao ser transportada para a membrana plasmática, a proteína perde o pró-domínio e se torna cataliticamente ativa em sua forma madura (Saftig and Lichtenthaler 2015).

A estrutura da ADAM10 é notavelmente complexa e a proteína pode ocorrer em diferentes isoformas. No contexto das plaquetas e neurônios, a ADAM10 assume uma configuração ativa, ancorada a membrana plasmática, desempenhando seu papel de metaloprotease ao clivar outras proteínas também ligadas à membrana (Bleibaum, Sommer et al. 2019, Pereira Vatanabe, Peron et al. 2021). Por outro lado, quando presente no plasma sanguíneo, observa-se uma transformação para uma forma solúvel e inativa, sugerindo uma possível desvinculação da membrana plasmática. A liberação do pró-domínio é um fator crucial para ativação da ADAM10 quando ancorada na membrana (Bleibaum, Sommer et al. 2019, Pereira Vatanabe, Peron et al. 2021).

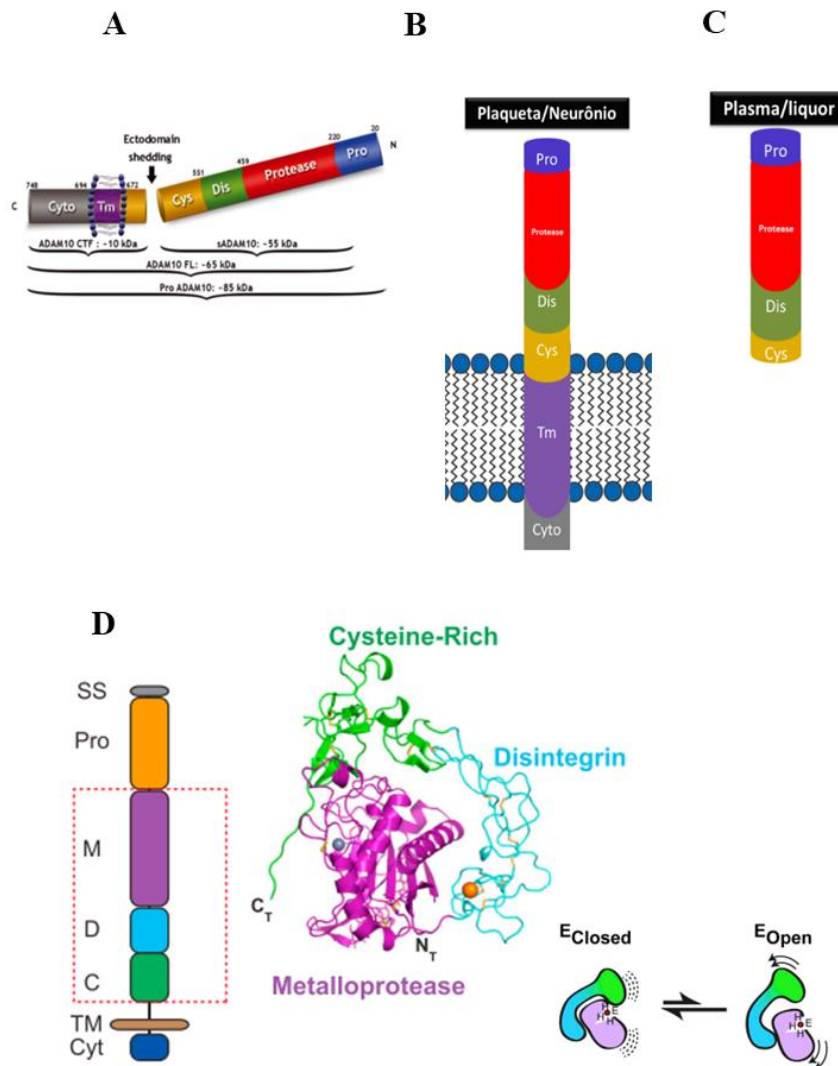
Já na forma solúvel, mesmo na ausência do pró-domínio, a proteína permanece inativa (Figura 4A). Essa organização multifacetada da ADAM10 permite que ela execute funções distintas dependendo do ambiente em que se encontra, desempenhando papéis críticos em processos biológicos complexos (Bleibaum, Sommer et al. 2019, Pereira Vatanabe, Peron et al. 2021).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa revelaram que os níveis da ADAM10 estão reduzidos em plaquetas (Manzine, de França Bram et al. 2013, Manzine, Barham et al. 2014) e aumentados no plasma de pessoas com DA (Grigoli 2020, Pereira Vatanabe, Peron et al. 2021, Oliveira Monteiro, Valle Pedroso et al. 2023). Essa diminuição dos níveis plaquetários de ADAM10 ativa e o respectivo aumento da proteína inativa no plasma de pessoas com DA, comparado a pessoas cognitivamente saudáveis, poderia ser um indicativo de menor atividade da proteína em pessoas com a doença, resultando em menor clivagem da APP pela via não-amiloidogênica (Figura 4B, C).

O crescente interesse na função da ADAM10 como uma α -secretase, operando na via não amiloidogênica da DA, tem sido recentemente destacado. O controle da expressão da ADAM10 ocorre de maneira extremamente complexa em níveis transcricionais, traducionais e pós-traducionais. A possibilidade de que intervenções destinadas a regular a atividade da ADAM10 em diferentes estágios possam resultar em melhorias

significativas nos desfechos clínicos para pacientes com DA requer uma investigação e testagem criteriosa (Peron, Vatanabe et al. 2018).

Figura 4. (A) Conformação em domínios da ADAM10: Cyto = domínio citoplasmático, Tm = domínio transmembrana, Cys = domínio rico em cisteína, região onde acontece a clivagem da ADAM10 por outras proteases e quando a proteína solúvel é liberada para o plasma e liquor, Dis = domínio desintegrina, Protease = domínio metaloprotease, responsável pela clivagem da proteína precursora do amiloide (APP) e Pro = pró-domínio, responsável por manter a ADAM10 inativa. A liberação do pró-domínio ativa esta proteína na membrana. (B) ADAM10 como ancorada à membrana de plaquetas e neurônios. (C) ADAM10 solúvel como encontrada no plasma e liquor, sem ancoragem à membrana. Nesta conformação, mesmo na ausência do pró-domínio a proteína apresenta-se inativa. Extraído e modificado de (Peron, Vatanabe et al. 2018). (D) Arquitetura geral do ectodomínio da ADAM10 humana madura. O íon catalítico de zinco é representado em cinza, enquanto um íon de cálcio é representado em laranja. Os resíduos de cisteína envolvidos em ligações dissulfeto são indicados como bastões. A ADAM10 também favorece uma conformação fechada e autoinibida (*EClosed*), na qual parte da proteína se dobra, bloqueando o acesso ao sítio ativo, em vez de uma conformação aberta (*EOpen*), na qual a proteína está pronta para clivar e modificar outras moléculas, permitindo acesso irrestrito ao substrato ao sítio ativo. Extraído e modificado de (Seegar, Killingsworth et al. 2017).



1.6 Células SH-SY5Y para estudos *in vitro* de doenças neurodegenerativas

Dispor de um sistema *in vitro* adequado que ofereça modelos translacionais para patologias humanas é uma condição integral das pesquisas da área de neurobiologia e neurociências. Historicamente, modelos experimentais *in vitro* aplicados na neurobiologia são compostos majoritariamente por cultura neuronal primária de ratos e camundongos (Shipley, Mangold et al. 2016).

A utilização de células neuronais primárias extraídas dos tecidos embrionários do SNC de mamíferos é de uso limitado. Uma vez que essas células são diferenciadas em neurônios maduros não é possível promover sua propagação por várias passagens (Kovalevich, Santerre et al. 2021). Algumas linhagens celulares neuronais como as derivadas de tumores malignos, apesar de algumas ressalvas, podem ser diferenciadas/transformadas em células neuronais, constituindo assim uma via alternativa para que estudos *in vitro* ultrapassem a limitação imposta pela cultura de células neuronais primárias (Kovalevich, Santerre et al. 2021). Apesar de muitos pesquisadores ainda confiarem nesse modelo, existe a necessidade de um componente humano que distinga os efeitos observados em cultura primária de animais para os efeitos correspondentes exclusivamente à espécie humana. Isso porque alguns efeitos observados com esse tipo de cultura podem ser exclusivos de suas respectivas espécies e podem não acontecer igualmente na espécie humana (Agholme, Lindström et al. 2010, Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016).

Embora as células de cultura primária sejam neurônios, elas podem possuir cariótipos instáveis, gerando problemas para estudos que avaliam expressão gênica, bem como para a reprodutibilidade de estudos de sinalização celular, por exemplo (Agholme, Lindström et al. 2010, Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016).

Neste contexto, a linhagem de células de neuroblastoma SH-SY5Y é a mais popular em estudos *in vitro*, já que pode ser diferenciada em células semelhantes a neurônios, exibindo fenótipos colinérgicos, adrenérgicos ou dopaminérgicos (Encinas, Iglesias et al. 2000, Lopes, Schröder et al. 2010, Kovalevich, Santerre et al. 2021). As células de neuroblastoma SH-SY5Y são derivadas de uma biópsia de tumor ósseo infantil do tipo metastático originário de células neurais embrionárias, sendo consideradas uma sublinhagem da linhagem parental SK-N-CH (ATCC®HTB-11™). As células SK-N-SH passaram por três processos de clonagem; inicialmente para SH-SY; na sequência para SH-SY5 e por fim para SH-SY5Y e foram depositadas na *American Type Culture Collection* (ATCC) em 1970 por June L. Biedler (Kovalevich, Santerre et al. 2021). Essas células apresentam características importantes que precisam ser levadas em consideração

para estudos *in vitro*. Em cultura, se apresentam como células tanto aderentes quanto flutuantes, sendo ambas viáveis para cultivo e realização de ensaios. No entanto, a grande maioria dos estudos utiliza apenas as células aderentes, descartando as flutuantes durante as trocas de meio de cultura (Kovalevich, Santerre et al. 2021).

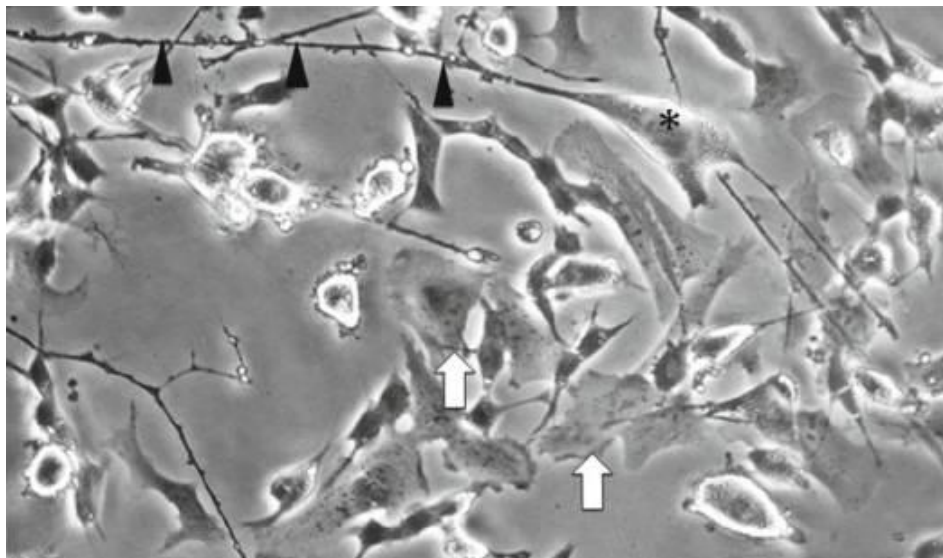
Os primeiros estudos mostraram que as células SK-N-SH parentais diferenciadas possuíam dois fenótipos morfológicamente diferentes, sendo células semelhantes a neuroblastos e células semelhantes a epiteliais, correspondendo respectivamente aos tipos “N” e “S” (Figura 5) (Kovalevich, Santerre et al. 2021). As células com morfologia similar a neuroblastos (N) são reativas para as enzimas tirosina hidroxilase (TH) e dopamina- β -hidroxilase, características de neurônios catecolaminérgicos. Em contrapartida, as células similares às epiteliais (S) não possuem essas atividades enzimáticas (Kovalevich, Santerre et al. 2021).

Além disso, as células SH-SY5Y possuem 47 cromossomos, com a particularidade de ter apenas um cromossomo repetido, o que confere a elas uma estabilidade cromossômica notável (Ross, Spengler et al. 1983, Gordon and Amini 2021). Essa característica é especialmente relevante para um modelo celular originário de um câncer, pois sugere que as células SH-SY5Y não exibem níveis extremos de aberração cromossômica. Essa estabilidade cromossômica, combinada com sua origem neuronal, proporciona uma plataforma confiável para estudar aspectos da neurobiologia e patologias cerebrais, incluindo a DA (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978, Ross, Spengler et al. 1983, Gordon and Amini 2021).

Comparativamente, o uso de células de neuroblastoma como as SH-SY5Y oferece diversas vantagens em relação a outras possibilidades de células-tronco que se diferenciam em neurônios, como as células-tronco embrionárias (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978, Kato, Kim et al. 2018, Gordon and Amini 2021). Primeiramente, as células de neuroblastoma são relativamente mais fáceis de obter e cultivar em laboratório, simplificando os processos de pesquisa e experimentação. Além disso, o uso de células de neuroblastoma evita questões éticas associadas às células-tronco embrionárias, tornando-as uma alternativa mais acessível (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978, Ross, Spengler et al. 1983, Gordon and Amini 2021). Ainda, esse modelo possui um grande potencial para realização de estudos bioquímicos e moleculares devido à sua suscetibilidade à manipulação genética e disponibilidade de uma ilimitada quantidade de células (Encinas, Iglesias et al. 2000). Ademais, as células de neuroblastoma derivam do cérebro, o que as torna um modelo apropriado para estudar a diferenciação e

funcionamento dos neurônios, levando a resultados mais consistentes e confiáveis (Gordon and Amini 2021).

Figura 5. Células diferenciadas em dois grupos de células morfológicamente distintos: “S” e “N”. As células do tipo “S” (setas brancas) são semelhantes às epiteliais e sem prolongamentos. As células “N” são semelhantes às células neuronais com corpos com estruturas piramidais (asterisco preto) e alongadas (setas pretas). Imagem extraída de (Kovalevich, Santerre et al. 2021).

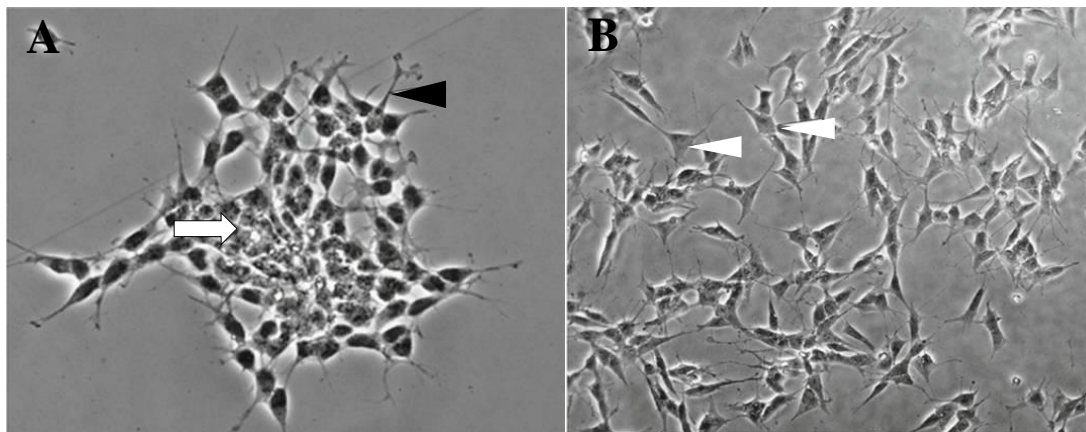


Apesar das células diferenciadas não possuírem fenótipo de células da glia, as células diferenciadas com ácido retinóico (AR) apresentam muitas das características presentes em cultura primária de neurônios (Encinas, Iglesias et al. 2000). Além disso, as células diferenciadas expressam marcadores neuronais, como neurofilamentos e proteínas associadas a microtúbulos (Kovalevich, Santerre et al. 2021).

No processo de neurodiferenciação *in vivo*, algumas proteínas sofrem mudanças em seus níveis de expressão como consequência da diferenciação celular (Constantinescu, Constantinescu et al. 2007). As células SH-SY5Y totalmente diferenciadas demonstraram expressar uma variedade de marcadores de neurônios maduros, como o antígeno nuclear neuronal (NeuN). Além disso, durante o processo de diferenciação, as células SH-SY5Y param de proliferar, estendem neuritos longos e expressam marcadores específicos de neurônios, com a β 3-tubulina (Constantinescu, Constantinescu et al. 2007, Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016)

O AR é a molécula mais comumente utilizada para a diferenciação das células SH-SY5Y (Kovalevich, Santerre et al. 2021). A exposição sequencial, durante 7 dias, das células SH-SY5Y ao AR, em meio com baixo teor de soro, produz populações de células morfológicamente semelhantes a neurônios (Figura 6) (Encinas, Iglesias et al. 2000).

Figura 6. (A) Células SH-SY5Y que não passaram pelo processo de diferenciação celular tendem ao crescimento agrupado podem formar conglomerados com morfologia mais arredondada (seta branca). Nas extremidades dos conglomerados, as células tendem a se estender e formar neuritos curtos (seta preta). (B) Células SH-SY5Y que passaram pelo processo de diferenciação celular não se aglomeram e possuem o corpo celular com a morfologia piramidal (setas brancas) e neuritos que começam a ser formados, lembrando dendritos e/ou axônios. Imagens extraídas de (Kovalevich, Santerre et al. 2021).



Na diferenciação neuronal induzida pelo AR, é possível observar a formação de neuritos, cujo comprimento aumenta de acordo com o tempo de exposição. Além disso, nessas células há um aumento na síntese de enzimas neuroespecíficas, como a acetilcolinesterase, de neurotransmissores como dopamina e alterações nos marcadores do citoesqueleto (neurofilamentos), entre outros (Constantinescu, Constantinescu et al. 2007). Todos esses efeitos são devido à indução promovida pelo AR de numerosos produtos gênicos, incluindo fatores de transcrição, proteínas estruturais, neurotransmissores, hormônios neuropeptídicos, fatores de crescimento, enzimas e receptores de superfície celular (Constantinescu, Constantinescu et al. 2007). Além disso, após o tratamento com AR, as células param na fase G1 do ciclo celular e assim, a síntese de DNA é inibida, o que promove a inibição da proliferação celular, que pode ser detectada já após 48 horas após o início do tratamento (Constantinescu, Constantinescu et al. 2007).

Apesar dessa linhagem celular se diferenciar em células similares a neurônios dopaminérgicos em resposta ao cultivo com baixo nível sérico e AR, poucos estudos investigaram as diferenças presentes entre as células SH-SY5Y proliferativas e as diferenciadas por AR (Lopes, Schröder et al. 2010). No entanto, mesmo com um número restrito de estudos publicados, a linhagem de células de neuroblastoma SH-SY5Y tem sido amplamente utilizada como potencial modelo *in vitro* em estudos de neurobiologia (Lopes, Schröder et al. 2010).

Entretanto, esses modelos, embora valiosos para compreender aspectos gerais de doenças, muitas vezes não conseguem reproduzir com precisão as complexas características e nuances específicas da patologia humana. A natureza intrincada e única do cérebro humano, combinada com as interações complexas entre genes e microambiente celular, limitam a capacidade desses modelos em capturar toda a gama de fatores envolvidos na DA (Zhao and Bhattacharyya 2018). Além disso, as respostas biológicas e os processos patológicos podem variar entre espécies, diminuindo a relevância dos resultados obtidos nos modelos animais, por exemplo. Portanto, embora essas abordagens sejam úteis em estágios iniciais de pesquisa, é essencial reconhecer suas limitações e buscar soluções mais avançadas, como modelos baseados em culturas celulares humanas e técnicas de cultivo tridimensional que possam oferecer uma visão mais precisa e detalhada da complexidade da DA (Zhao and Bhattacharyya 2018).

Sendo assim, é fundamental que um modelo mais consistente para o estudo de doenças neurológicas humanas seja desenvolvido. A utilização de proteínas da matriz extracelular (MEC) e fatores neurotróficos pode auxiliar nesse sentido (Agholme, Lindström et al. 2010, Shipley, Mangold et al. 2016). A aplicação de MEC, por exemplo, permite que os neurônios se diferenciem de maneira mais homogênea, pois possibilita a ligação de proteínas de adesão específicas presentes nas células, a proteínas da MEC, tornando o modelo fisiologicamente mais próximo do ambiente cerebral real.

Desse modo, os resultados na literatura mostram que a diferenciação celular de células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y de um fenótipo inicial de células semelhantes a epiteliais em um fenótipo neuronal mais expansivo e ramificado é possível através da utilização de componentes da MEC (Agholme, Lindström et al. 2010, Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016). Isso permite resultados mais confiáveis, pois produzem populações de culturas neuronais homogêneas que podem ser utilizadas para análises bioquímicas e moleculares, fornecendo aos pesquisadores um modelo translacional mais preciso para o estudo de doenças humanas (Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as diferenças entre os níveis de ADAM10 e IDE nas células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y, diferenciadas em neurônios e cultivadas em meio hiperglicêmico e normoglicêmico, de forma a contribuir com estudos sobre a relação entre DM2 e DA.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a diferenciação celular da linhagem SH-SY5Y em células semelhantes a neurônios usando AR ou componentes da matriz extracelular.
- Investigar os níveis de ADAM10 em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y diferenciadas em neurônios e tratadas com meio de cultura hiperglicêmico e normoglicêmico.
- Investigar os níveis de IDE em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y diferenciadas em neurônios e tratadas com meio de cultura hiperglicêmico e normoglicêmico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1) – *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F12 (Ham)* (Cat. No.11330-032, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS, Cat. No. S0011, *Vitrocell Embriolife*), 1% de solução de piruvato de sódio – *Sodium pyruvate solution* (Cat. No. S8636, *Sigma Life Science*) e 0,1% de solução de aminoácidos não essenciais - *MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x)* (Cat. No. M7145, *Sigma Life Science*). As células foram mantidas a 37°C em umidade saturada contendo 5% de CO₂. A detecção de micoplasma foi realizada regularmente por PCR e eletroforese em gel de agarose e por *diamidino-2-phenylindole* (DAPI).

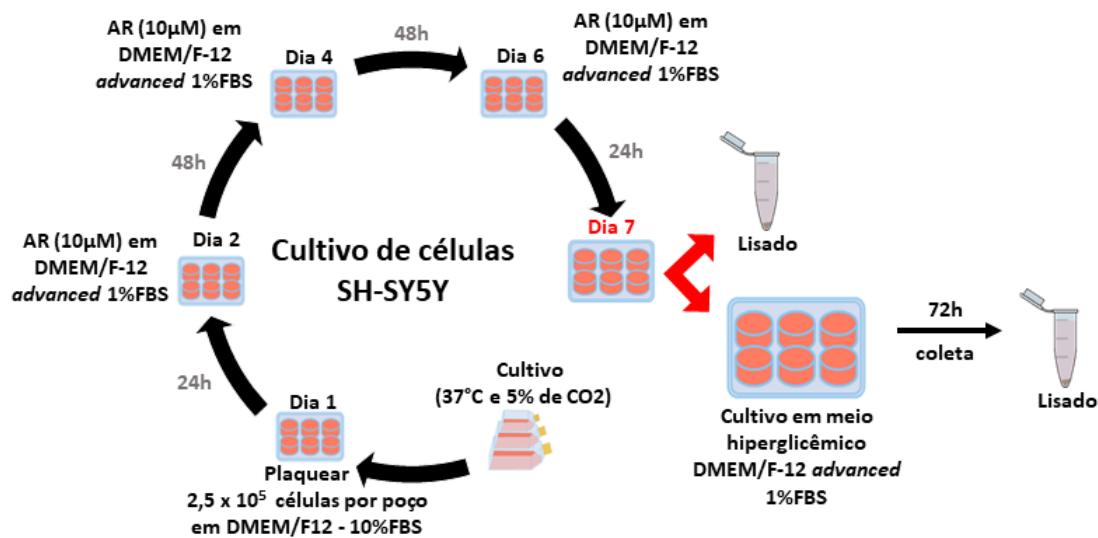
3.2 Diferenciação das células SH-SY5Y em meio hiperglicêmico

A diferenciação das células SH-SY5Y em células semelhantes a neurônios foi realizada pelo tratamento com AR – all-trans Retinoic Acid (Cat.No.11017, Cayman Chemical Company). De maneira a comparar a diferenciação das células, dois protocolos foram desenvolvidos, sendo um em monocamada e sem a presença de proteína da matriz extracelular e outro utilizando coating de Matrigel® (MEC). As células semelhantes a neurônios foram cultivadas por 72 h em meio hiperglicêmico, utilizando 55 mM de glicose (D-Glicose anidra – dextrose, G1008.01.AG, Synth) e 2 mM de glucosamina (D-(+)-Glucosamine hydrochloride, G4875, Sigma Life Science) (Lama, Pirozzi et al. 2022).

No processo de diferenciação celular em monocamada e sem a presença de proteínas da MEC (Figura 7), as células foram plaqueadas em uma densidade de $2,5 \times 10^5$

em placas de cultura de 6 poços (35mm). Após 24 h do plaqueamento as células receberam 10 μ M de AR em DMEM/F-12 *advanced* – (Cat.No.12634-010, GIBCO) suplementado com 1% de FBS e 4 mM de GlutaMXTM-I (Cat.No.35050-061, GIBCO). As células foram cultivadas nestas condições por 7 dias, sendo o meio de cultura substituído a cada 48 h por meio fresco (de Medeiros, De Bastiani et al. 2019). Conforme descrito anteriormente, ao final do processo de diferenciação as células foram mantidas por 72h em meio DMEM/F-12 *advanced* 1% FBS, suplementado com solução hiperglicêmica (55 mM de glicose e 2 mM de glucosamina).

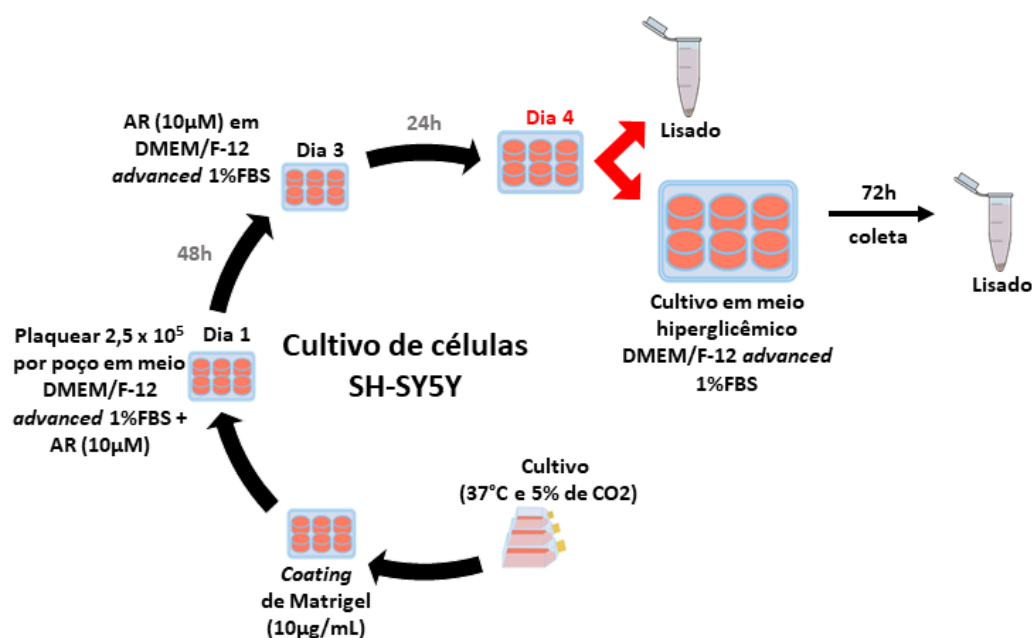
Figura 7. Protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR, sem presença de MEC, cultivadas por 72 h em meio hiperglicêmico.



De modo a aprimorar a técnica de diferenciação das células SH-SY5Y em células semelhantes a neurônios, um protocolo foi desenvolvido utilizando *coating* de Matrigel[®] derivada da membrana basal solubilizada do sarcoma de camundongo *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS), um tumor rico em proteínas da MEC. A composição da Matrigel[®] utilizada neste estudo inclui: laminina (componente principal - 60%), colágeno IV (30%), proteoglicanos de heparan sulfato, entactina/nidogênio (8%), sendo que a Matrigel[®] utilizada neste estudo possui IGF-1 (5 ng/mL); fator de crescimento transformador β (TGF- β) (1,7 ng/mL); fator de crescimento epidermal (EGF) (<0,5 ng/mL); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (<5 pg/mL); fator de crescimento neuronal (NGF) (<0,2 ng/mL) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (1,0-1,5 ng/mL) - (10 μ g/mL, Cat. No. 354230, Corning).

O *coating* foi feito em placa de 6 poços gelada, com Matrigel diluída 1:1000 em meio DMEM/F12. Para solidificação do *coating* a placa foi mantida por 30min em estufa a 37°C. Após, as células foram plaqueadas por 48h em meio DMEM/F-12 advanced 1% FBS tratamento contendo 10 µM de AR em meio DMEM/F-12 advanced 1% FBS, como já descrito anteriormente. As células foram cultivadas nestas condições por 4 dias, sendo o meio de cultura substituído a cada 48 h por meio fresco (Figura 8). Posterior ao processo de diferenciação celular (dia 4), as células foram mantidas por 72 h em meio DMEM/F-12 advanced 1% FBS hiperglicêmico, de forma igual ao protocolo que não utilizou a MEC.

Figura 8. Protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR em coating de Matrigel®, cultivadas por 72 h em meio hiperglicêmico.



3.3 Preparo do lisado celular

As células foram coletadas no quarto, sétimo e/ou décimo dia, a depender do protocolo aplicado. Com a placa no gelo, as células foram lavadas cuidadosamente com 1mL de PBS e removidas com auxílio de um *cell scraper*, essa etapa foi repetida 3 vezes. As células foram coletadas em tubos de centrifugação de 15 mL e mantidas no gelo. Na sequência os tubos foram centrifugados a 1.200 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuscitado em 100 µL de tampão de lise *CellLytic™M* (Cat. No. C2978, Sigma Life Science) e transferido para microtubos de 1,5 mL. O lisado foi incubado a -80°C por 30min e em seguida, centrifugado a 12.000 rpm,

por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado para posterior ensaio de quantificação de proteínas totais.

3.4 Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais, 10 µL de amostras de lisado celular foram adicionados em uma placa de 96 poços e o kit de quantificação BCA (*Thermo Scientific*) foi utilizado segundo instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento *Synergy HI* em 540nm. Em seguida, após determinada a concentração de proteínas totais, foi realizada a técnica de SDS-PAGE seguida por *western blotting*.

3.5 SDS-PAGE e *western blotting*

O volume para 6,5µg/µL de proteína foi diluído em 7µL de tampão *Laemmli* (*BioRad*). Antes da aplicação nos géis de poli(acrilamida em gradiente de 4-20% – *Mini-PROTEAN TGX Gels* (Cat. No. #4561096, *BioRad*), as amostras foram fervidas a 100°C por 5min em banho seco. Os ensaios de eletroforese foram realizados durante 90 min a 100V e em seguida as proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose – *Trans-Blot Turbo Transfer Pack* (Cat. No. #1704158, *BioRad*) no sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (*BioRad*) a 2.5A e 25V durante 3 min. Para confirmar a eficiência das transferências, as membranas de nitrocelulose foram coradas com 0,2% de solução aquosa de *Ponceau S* em 1% de ácido acético. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 h em solução de bloqueio (5% leite desnatado em TBST) em temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas em TBST as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-β3-tubulina (*mAb5666*, *Cell Signaling*, 1:1000 em solução BSA 5% em TBST), anti-ADAM10 (Cat. No.2051, *ProSci*, 1:500 em *TBS 1% Casein Blocker*, Cat. No. #1610782) e anti-IDE (*ab133561*, 1:1000 em *TBS 1% Casein Blocker*). Em seguida, as membranas foram lavadas em três etapas de 5 min cada em TBST e incubadas por 1 h em anticorpo secundário (*ab97051*). Como controle endógeno foi utilizado o anticorpo anti-β-actina-HRP (*5125S*, *Cell Signaling*, 1:1000 em *TBS 1% Casein Blocker*), com incubação durante 1 h em temperatura ambiente, sob leve agitação. A revelação das proteínas seguiu o protocolo do *kit Clarity™ Western ECL Substrate* (Cat. No. #170-5060, *BioRad*) e a captura das imagens foi realizado com o fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System* (*BioRad*).

Após a revelação das membranas, as bandas marcadas pela reação com os anticorpos foram quantificadas com auxílio do *software ImageJ*. Para obtenção dos valores finais foi calculada a razão entre as médias das proteínas de interesse pelas médias

da β -actina de cada amostra correspondente. O parâmetro para análise foi o volume ajustado das bandas, que significa o volume total, diminuído do *background*.

3.6 Imunofluorescência

Para investigar a eficácia dos protocolos de diferenciação celular com AR na ausência ou presença de MEC e posterior cultivo em meio hiperglicêmico, as células foram cultivadas em lâminas tipo *chambers slides*. Após, as lâminas foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 20 min e submetidas a três lavagens de 10 min cada com PBS-glicina 50mM. As lâminas foram bloqueadas com solução de imunofluorescência (IF) (1.3mM NaCl, 132mM Na₂HPO₄, 34.5mM NaH₂PO₄, 77mM NaN₃, 1% BSA, Triton X-100 e 0,5% Tween 20, pH 7.4), contendo 10% de albumina de soro bovino (BSA) e fragmentos de anticorpos Goat F(ab')₂ Anti-Mouse IgG - (Fab')₂, *pre-adsorbed* (1:1000) (ab98754), durante 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, ocorreu a incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-NeuN (1:250) (*Cell Signaling, Cat. No. 12943S*). Em seguida, as lâminas foram submetidas a três novas lavagens com solução IF por 20 min cada. A etapa de incubação com anticorpos secundários utilizou os anticorpos Alexa Fluor-488 e -568 (1:500) (*Molecular probes by life Technologies, Ref: A11034 e A11011*), específicos para o anticorpo primário aplicado, e o marcador de citoesqueleto Alexa Fluor 488 *phalloidin* (*Molecular probes by life Technologies, Ref: A12379*). Após outras duas novas lavagens de 10 min cada com PBS, as lâminas foram coradas com DAPI (0,5 mg/mL, *abcam, ab228549*) por 4 min à temperatura ambiente, seguido por outra lavagem com PBS por 10 min antes da montagem das lâminas com *Fluoromount G (Eletron Microcopy Sciences)*.

A visualização das lâminas foi realizada através de um microscópio Confocal Leica TCS SP8, e a análise foi conduzida com o software LAS X Office, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

3.7 Medição de neuritos e análises estatísticas

Os dados obtidos foram planilhados utilizando o *software* Microsoft Excel. A normalidade dos dados foi averiguada através dos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro Wilk*. Os comprimentos dos neuritos foram medidos via *software ImageJ Fiji* (Pemberton, Mersman et al. 2018). Os testes estatísticos e os gráficos foram feitos utilizando o *software GraphPad Prism 8*, e para esses foi adotado nível de significância de 5%. As análises referentes aos comprimentos dos neuritos e aos níveis de β 3-tubulina,

ADAM10 e IDE foram realizadas utilizando o teste *t* de *Student* para amostras independentes e *Ordinary one-way ANOVA* para análises de variância de um fator.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

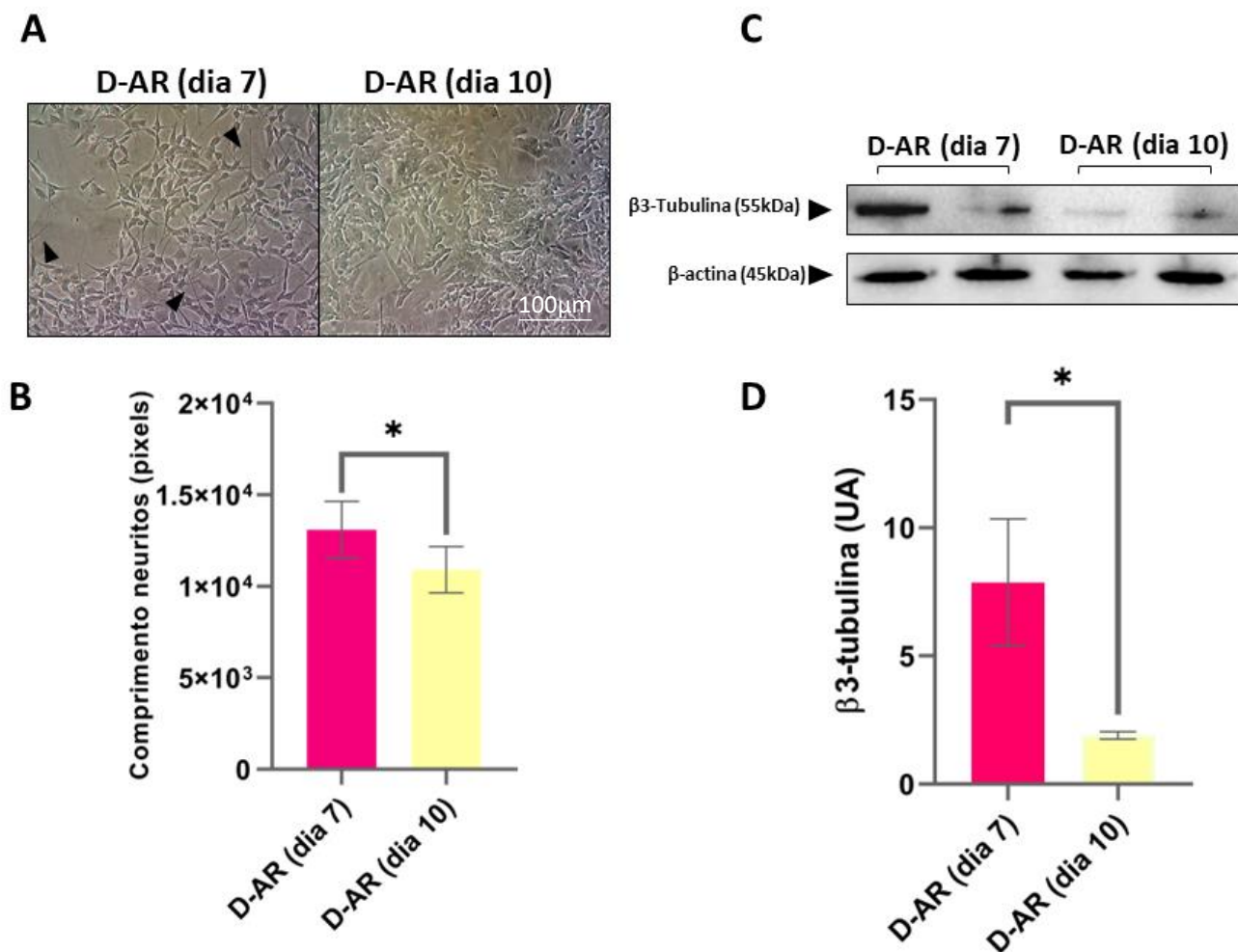
4.1 Diferenciação celular

Este procedimento possibilitou a obtenção de células neuronais diferenciadas, visando a sua aplicação em experimentos que mimetizam o ambiente hiperglicêmico semelhante ao que ocorre na DM2. No contexto deste trabalho, as terminologias “hiperglicemia” e “normoglicemia” serão utilizadas de forma distinta das comumente associadas à medição de glicose no sangue. O meio de cultura sem suplementação de glicose ou glucosamina será denominado “normoglicêmico”, enquanto o meio com suplementação com essas moléculas será referido como “hiperglicêmico”.

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram expostas ao AR, uma forma oxidada da vitamina A, que exerce papel fundamental no desenvolvimento e diferenciação de várias células, incluindo neurônios (Encinas, Iglesias et al. 2000, Constantinescu, Constantinescu et al. 2007). Especificamente na diferenciação neuronal, o AR é frequentemente utilizado em culturas celulares *in vitro*, com o intuito de mimetizar os sinais moleculares que as células neurais naturalmente apresentam (Encinas, Iglesias et al. 2000, Constantinescu, Constantinescu et al. 2007).

Nesse estudo, após o procedimento de diferenciação com AR, foi observada uma rápida desdiferenciação das células após aproximadamente 10 dias do tratamento exclusivo com AR (D-AR). A imagem em campo claro (Figura 9A) e o respectivo gráfico (Figura 9B) revelam a diminuição dos comprimentos dos neuritos nas células D-AR no dia 10, em comparação com as células D-AR no dia 7, logo após o último dia de tratamento com AR. Para confirmar o processo de desdiferenciação, foi realizada uma quantificação da proteína β 3-tubulina. Os resultados mostraram uma redução significativa nos níveis dessa proteína no dia 10 (Figura 9C, D), indicando claramente o processo de desdiferenciação das células, após a retirada do AR.

Figura 9. (A) Células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico (D-AR, dia 7) e células após 10 dias do tratamento exclusivo com AR (D-AR, dia 10). Os neuritos estão indicados nas setas pretas. As imagens de campo claro foram adquiridas em aumento 20×, no microscópio Nikon Eclipse TS100. (B) Representação gráfica do comprimento dos neuritos. Teste t (D-AR, dia 7 vs D-AR, dia 10; *p = 0,0155). (C) Membranas de *western blotting* mostrando a presença de β 3-tubulina (55kDa) e β -actina (controle endógeno, 45kDa) em cada tratamento. (D) Representação gráfica dos níveis de β 3-tubulina (D-AR, dia 7; D-AR, dia 10). Teste t (D-AR, dia 7 vs D-AR dia 10, *p = 0,0387).



A desdiferenciação das células diferenciadas com AR no décimo dia do tratamento exigiu o desenvolvimento de um modelo *in vitro* mais fidedigno para a continuidade deste estudo. A inclusão de proteínas da MEC e fatores neurotróficos emerge como uma tentativa promissora nesse contexto. Com esse propósito, foi utilizado Matrigel[®], um material que favorece a diferenciação neuronal de modo mais uniforme e homogêneo (Figura 10A) (Li, Cui et al. 2022).

Para verificar se a presença da MEC no processo de diferenciação efetivamente estabelecia um modelo *in vitro* mais duradouro ao comparado com o uso isolado de AR, foi realizada à quantificação dos comprimentos dos neuritos em dois momentos distintos: no último dia de tratamento com AR – dia 4, no dia 7, e no dia 10 que corresponde respectivamente a três e 6 dias após a cessação do tratamento com AR. O objetivo era

avaliar se seria possível evitar o processo de desdiferenciação semelhante ao cenário anterior. A análise dos dados por meio da representação gráfica revelou que não há redução significativa nos comprimentos dos neuritos no dia 10 (Figura 10B).

Além disso, para avaliar o processo de desdiferenciação, foi procedido à quantificação da proteína β 3-tubulina, cujos resultados indicaram que a presença da MEC propiciou a manutenção do estado de diferenciação das células mesmo após a interrupção do tratamento com AR, conforme observado no dia 10 em comparação com dia 4 (Figura 10C, D). Ao comparar a expressão de β 3-tubulina nas células cultivadas somente na presença de AR após o 10º dia (Figura 9C, D) fica claro que a presença da MEC prolonga o tempo de diferenciação celular.

A Matrigel[®] deriva da membrana basal solubilizada do sarcoma de camundongo *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS), um tumor rico em proteínas da MEC, conforme descrito no item 3.2. Diante dos resultados encontrados, podemos inferir que a incorporação de proteínas da MEC no processo de diferenciação das células SH-SY5Y é crucial, uma vez que prolonga sua efetividade, possivelmente porque viabiliza a ligação específica das proteínas de adesão celular às proteínas da MEC, conferindo ao modelo uma maior semelhança fisiológica com o ambiente cerebral (Li, Cui et al. 2022).

Vários estudos analisaram a diferenciação das células de neuroblastoma SH-SY5Y, explorando diferentes substratos, entre eles, a laminina presente no Matrigel[®] (Constantinescu, Constantinescu et al. 2007, Agholme, Lindström et al. 2010, Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016). Evidências destacam a laminina como uma das principais proteínas presentes na MEC, desempenhando um papel essencial na diferenciação neuronal e no desenvolvimento do sistema nervoso. Assim, a laminina transcende seu papel meramente estrutural, atuando como uma molécula de sinalização intracelular que regula a expressão gênica e a diferenciação celular (Freire, Gomes et al. 2002, Scherer 2002, Kang and Yao 2022). Além disso, a laminina desempenha um papel crucial na neurogênese, que é o processo por quais novos neurônios são gerados a partir de células-tronco ou células progenitoras neurais, evidenciando a importância dessa proteína na regulação e suporte do desenvolvimento neuronal (Flanagan, Rebaza et al. 2006, Ma, Tavakoli et al. 2008). Sua presença orienta as células-tronco em direção à linhagem neuronal e mantém a sobrevivência e diferenciação apropriada, levando à maturação dos neurônios (Freire, Gomes et al. 2002, Ma, Tavakoli et al. 2008).

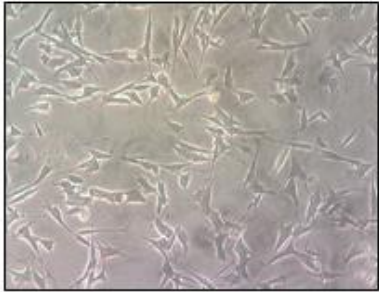
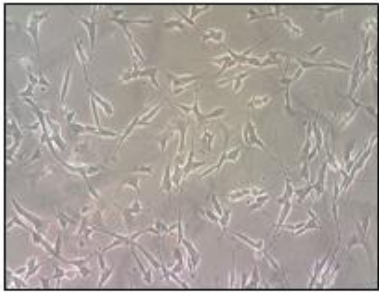
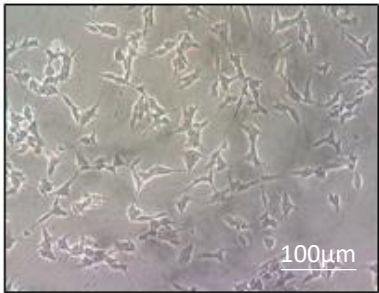
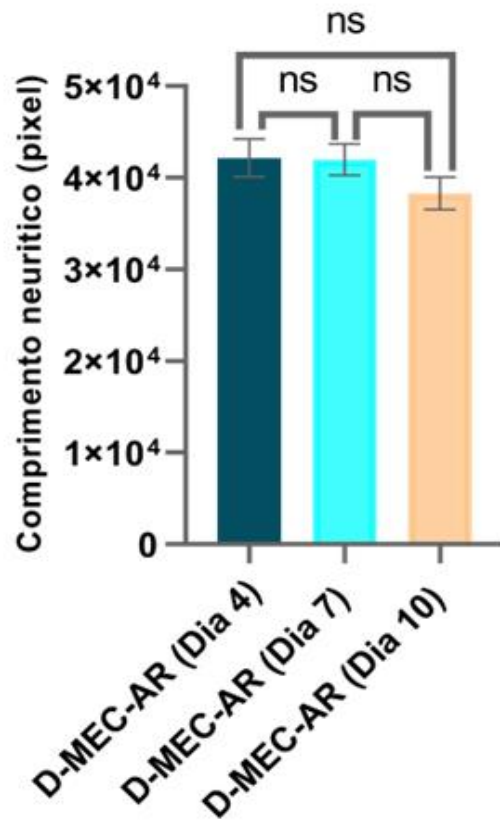
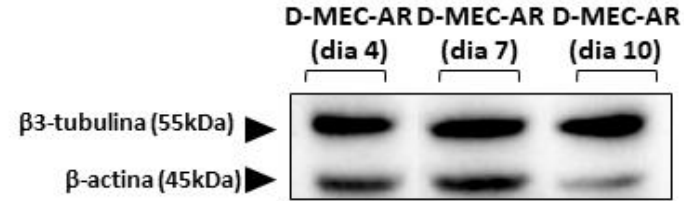
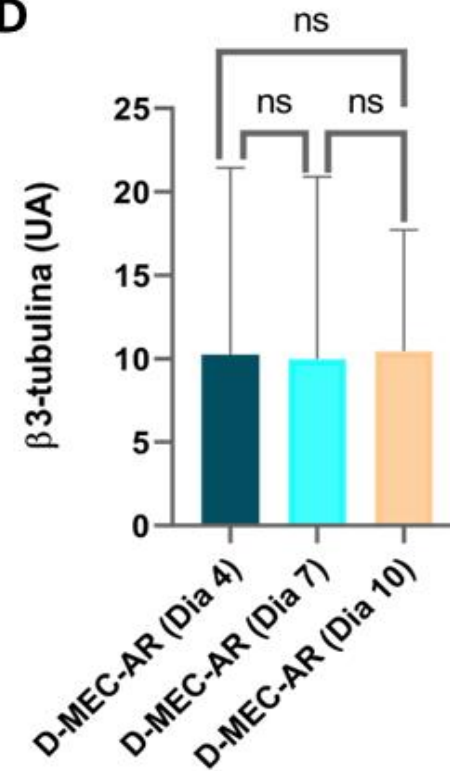
A**D-MEC-AR (dia 4)****D-MEC-AR (dia 7)****D-MEC-AR (dia 10)****B****C****D**

Figura 10. (A) Células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico na presença de MEC (D-MEC-AR, dia 4), células após 3 dias do tratamento exclusivo com AR na presença de MEC (D-MEC-AR, dia 7) e células após 6 dias do tratamento exclusivo com AR na presença de MEC (D-MEC-AR, dia 10). As imagens de campo claro foram adquiridas em aumento 20× no microscópio Nikon Eclipse TS100. (B) Representação gráfica do comprimento dos neuritos. (C) Membranas de *western blotting* mostrando a presença de β3-tubulina (55kDa) e β-actina (controle endógeno, 45kDa) em cada tratamento. (D) Representação gráfica dos níveis de β3-tubulina. ns = não significativo.

A literatura mostra que a diferenciação neuronal e o crescimento dos neuritos foram mais expressivos na presença de laminina e Matrigel®, em comparação com outros substratos. Além disso, a integrina $\alpha 6\beta 1$ mostra-se um componente crucial da sinalização que impulsiona a diferenciação mediada pela laminina (Flanagan, Rebaza et al. 2006, Ma, Tavakoli et al. 2008). Investigações em curso resultantes desse estudo buscam aprimorar o protocolo e confirmar a hipótese de que a integrina $\alpha 6\beta 1$ também exerce um papel central na diferenciação das células SH-SY5Y quando expostas a uma matriz enriquecida com laminina (Flanagan, Rebaza et al. 2006).

A observação de que a laminina induz um crescimento significativamente maior de neuritos, quando comparada às células sem presença de laminina, não é apenas notável, mas também está em consonância com as evidências disponíveis (Dwane, Durack et al. 2013). As lamininas, como um grupo crucial de glicoproteínas, representam um componente primordial na MEC do cérebro em desenvolvimento. Essas glicoproteínas exercem influência marcante ao estimular o crescimento de neuritos em um espectro diversificado de células neuronais *in vitro* (Dwane, Durack et al. 2013). Tal observação ressalta a importância intrínseca da laminina como um componente da MEC na regulação das vias neurais, fornecendo assim uma base sólida para a compreensão dos mecanismos de diferenciação e crescimento celular.

Adicionalmente, estudos demonstraram que essa população celular diferenciada apresenta uma distinção marcante das células indiferenciadas, tanto em seu perfil de adesão, quanto de proliferação (Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016). Além disso, os resultados obtidos por Dwane e colaboradores confirmaram que quando as células SH-SY5Y são cultivadas em meio contendo laminina ocorre não apenas uma diferenciação morfológica notável, mas também uma diferenciação bioquímica. Tais achados contribuem de maneira significativa para os resultados do presente estudo.

Além das imagens de microscopia, o processo de diferenciação celular também foi confirmado por imunocoloração, pela marcação de uma segunda proteína neuronal, a NeuN (Figura 11). A visualização gráfica da marcação de $\beta 3$ -tubulina, o comprimento dos neuritos e a marcação da NeuN em células ND, D-AR e D-MEC-AR estão apresentadas na Figura 11A-D, respectivamente.

Os resultados mostram que a morfologia das células não diferenciadas é arredondada, com a presença de poucos prolongamentos celulares, especialmente após 7 dias de cultivo, quando, naturalmente, a cultura alcança sua maior densidade (Figura

11A). Já nas células diferenciadas com presença de MEC, foram observados maior presença de neuritos, que se mantêm presentes após o quarto dia em cultivo e em menor densidade celular, quando comparado às células não diferenciadas (Figura 11A, B).

A menor densidade neuronal das células diferenciadas é observada devido ao tratamento com AR, o qual induz a parada do ciclo celular na fase G1 e assim, inibe a síntese de DNA (Agholme, Lindström et al. 2010).

A figura 11A também mostra o aumento, comparado às células ND, na marcação do citoesqueleto com faloidina (em verde) e NeuN (em vermelho) nas células D-AR e D-MEC-AR. Assim, os resultados obtidos nesse estudo indicam um aumento notável na expressão da β 3-tubulina e NeuN nas células SH-SY5Y diferenciadas com AR na presença de MEC (Figura 11, CD). É importante notar que a presença de β 3-tubulina ocorreu em todos os cultivos (ND, D-AR e D-MEC-AR) (Figura 11C, D). A presença mínima de β 3-tubulina nas células ND deriva da origem das células de neuroblastoma SH-SY5Y, que provêm das células parentais SK-N-SH com fenótipos morfológicamente distintos, assemelhando-se a neuroblastos e células epiteliais (Kovalevich, Santerre et al. 2021).

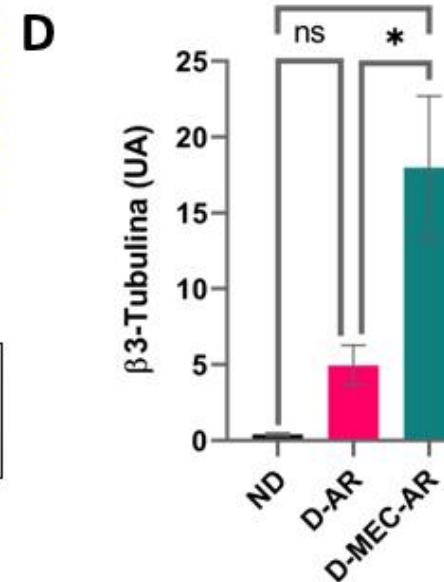
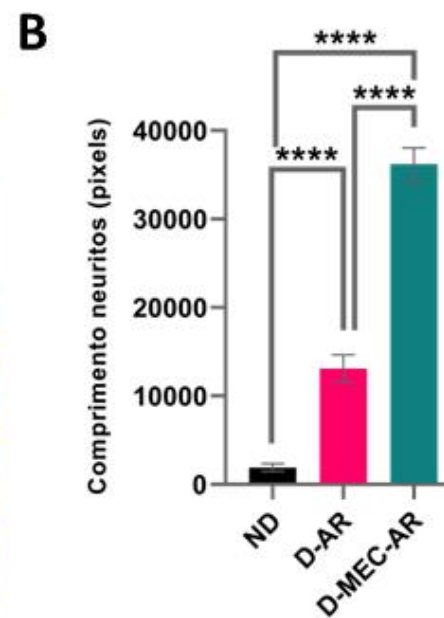
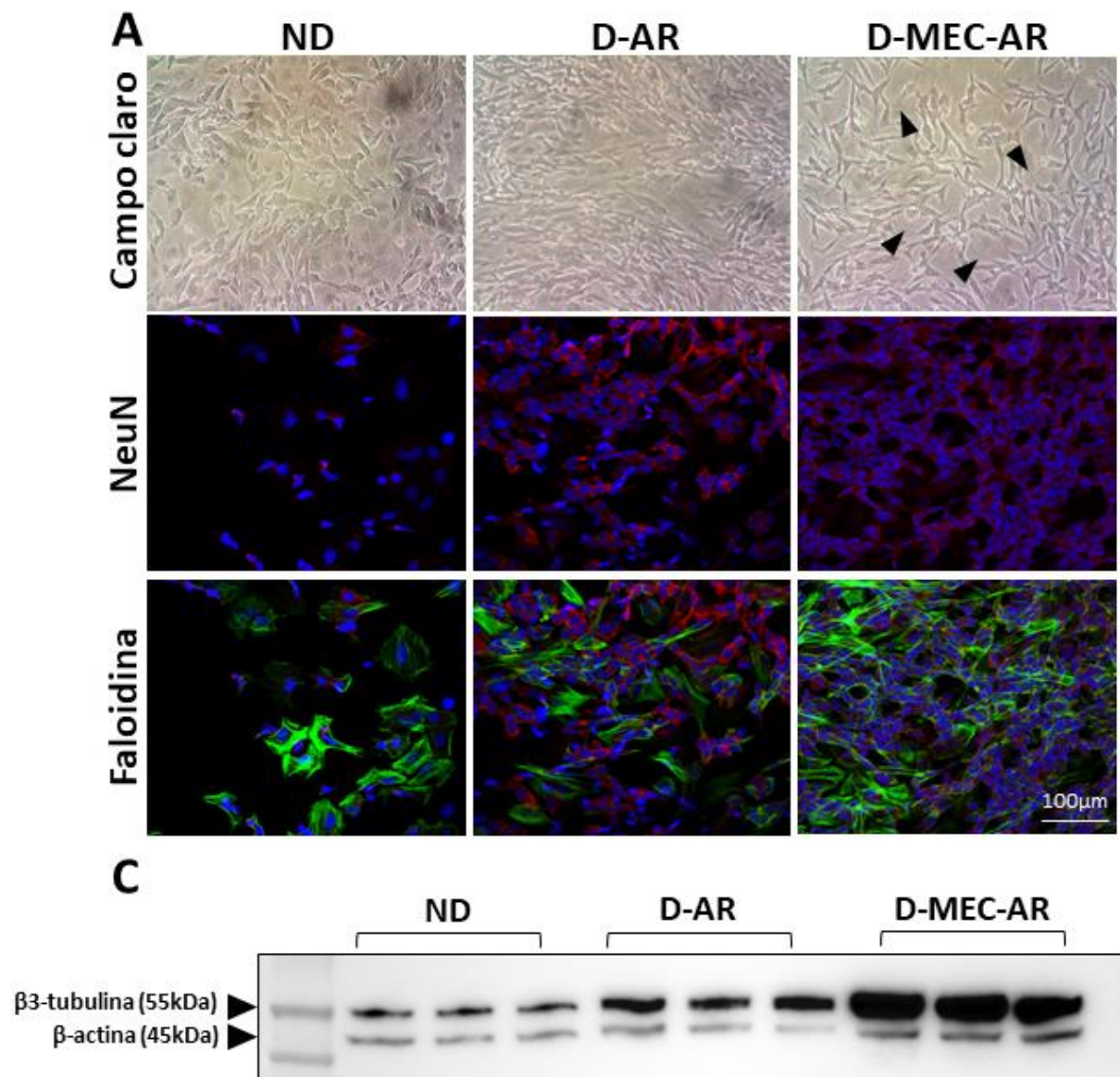


Figura 11. (A) Células SH-SY5Y não diferenciadas (ND) e diferenciadas com ácido retinóico na ausência (D-AR, 10 μ M de AR) ou presença de Matrigel[®] (10mg/mL de Matrigel e 10 μ M de AR, D-MEC-AR), logo após o processo de diferenciação com AR. Os neuritos estão indicados nas setas pretas. As imagens de campo claro foram adquiridas em aumento 20 \times no microscópio Nikon Eclipse TS100. As imagens de imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal Leica TCS SP8. As estruturas celulares marcadas em verde representam a faloidina, em vermelho a NeuN e em azul o DAPI. (B) O comprimento dos neuritos foi avaliado com auxílio do software ImageJ. (C) Membranas de western blotting mostrando a presença de β 3-tubulina (55kDa) e β -actina (controle endógeno, 45kDa) em cada tratamento. (D) Representação gráfica dos níveis de β 3-tubulina. Teste ANOVA (ND vs D-MEC-AR *** $p = 0,0007$; D-AR vs D-MEC-AR * $p=0,0128$).

As células com morfologia semelhante a neurolastos (N) exibem reatividade às enzimas TH e dopamina- β -hidroxilase, características de neurônios catecolaminérgicos, e podem apresentar níveis basais da proteína β 3-tubulina (Forster, Köglsberger et al. 2016). Em contraste, células com aparência epitelial (S) não possuem essas atividades enzimáticas (Kovalevich, Santerre et al. 2021). Embora as células diferenciadas não demonstrem o fenótipo de células da glia, as células diferenciadas com AR compartilham muitas das características encontradas em culturas primárias de neurônios (Encinas, Iglesias et al. 2000).

A proteína NeuN está presente no núcleo e no citoplasma perinuclear de neurônios maduros e é específica para neurônios. Ela se liga ao RNA e possivelmente está envolvida no processo de *splicing* alternativo em células neurais (Duan, Zhang et al. 2016). A NeuN é frequentemente usada como marcador neuronal em estudos *in vitro* (Gusel'Nikova and Korzhevskiy 2015).

A proteína β 3-tubulina, uma isoforma da subunidade β dos dímeros de tubulina que compõe os microtúbulos, desempenha um papel fundamental no crescimento axonal e na formação de neuritos durante o desenvolvimento neuronal (Ferreira and Caceres 1992, Guo, Qiang et al. 2011). Durante o desenvolvimento embrionário, sua expressão aumenta à medida que as células neurais migram e se diferenciam (Guo, Qiang et al. 2011). Assim, a β 3-tubulina é amplamente usada como marcadora de diferenciação em culturas celulares.

Em síntese, os resultados mostraram que a presença de MEC enriquecida com laminina resultou em aumento tanto na quantidade quanto no comprimento dos neuritos, acompanhado por intensificação na expressão dos marcadores neuronais nas células. Esses achados estão em consonância a literatura, que constatou aumento significativo na quantidade de células SH-SY5Y diferenciadas em presença de laminina e no comprimento dos neuritos destas células (Dwane, Durack et al. 2013).

4.2 Níveis de ADAM10 na presença de MEC

Considerando que alguns estudos indicam que o AR pode aumentar a expressão da ADAM10 (Tippmann, Hundt et al. 2009), que tem sua estrutura apresentada na figura 12A, foi realizada uma análise quantitativa dos níveis da ADAM10 por *western blotting* após a diferenciação das células (D-AR e D-MEC-AR), em comparação com as células ND. Os resultados não mostraram diferenças significativas nos níveis de ADAM10 entre as células ND e D-AR (Figura 12B, C). No entanto, a diferenciação com *coating* de Matrigel® (D-MEC-AR) mostrou aumento significativo nos níveis da forma ativa

(65kDa) desta proteína (Figura 12B, C). O aumento dos níveis de ADAM10 em culturas celulares expostas à MEC pode ser explicado por diferentes fatores. Um possível mecanismo é que a MEC fornece proteínas e fatores de crescimento que podem influenciar a expressão e a atividade de várias proteínas, incluindo a ADAM10 (Maretzky, Evers et al. 2015, Min, Tang et al. 2018). Além disso, a MEC pode fornecer um ambiente mais próximo do natural para as células, promovendo sua diferenciação e atividade celular (Li, Cui et al. 2022). Isso poderia levar a uma regulação positiva da ADAM10, uma vez que a proteína desempenha um papel importante na homeostase e função celular e neuronal (Li, Cui et al. 2022). Além dos fatores mencionados anteriormente, a interação das células com a MEC também pode influenciar a ativação de vias de sinalização celular, que afetam diretamente a expressão da ADAM10. A MEC pode fornecer pontos de ancoragem para as células, ativando vias de sinalização como aquelas envolvidas na adesão celular e na comunicação célula-matriz (Oharazawa, Ibaraki et al. 1999, Schlie-Wolter, Ngezahayo et al. 2013).

Entre as vias de sinalização celular que ocasionam impacto direto nos níveis da ADAM10, destacam-se as vias das integrinas, que respondem à interação célula-matriz; as vias MAPK e PI3K/Akt, associadas ao crescimento e à sobrevivência celular; as vias de sinalização Wnt, cruciais para o desenvolvimento e a homeostase; as vias NF- κ B, envolvidas em processos inflamatórios e imunológicos; e as vias de sinalização Notch, que regulam a diferenciação celular (Wan, Li et al. 2012, Tsai, VanDussen et al. 2014, Min, Tang et al. 2018). Essas vias podem ser ativadas pela MEC, desencadeando respostas intracelulares que podem afetar a expressão de genes, incluindo aqueles associados a ADAM10 (Khavinson, Linkova et al. 2020).

No entanto, é importante notar que a resposta das células à MEC pode variar dependendo do tipo celular, das condições de cultivo e de outros fatores. Portanto é necessário realizar estudos específicos para entender os mecanismos subjacentes ao aumento dos níveis de ADAM10 em resposta à exposição à MEC no contexto específico das células de neuroblastoma diferenciadas. Um exemplo de experimento que poderia ser realizado é a incubação das células, previamente ao seu plaqueamento no *coating* de Matrigel, com anticorpos bloqueadores da $\alpha 6 \beta 1$, integrina para a qual a laminina tem afinidade (Takizawa, Arimori et al. 2017). Isso permitiria avaliar se o bloqueio da interação da MEC com essa integrina específica inibiria a expressão da ADAM10, mostrando assim o papel da ECM nessa regulação.

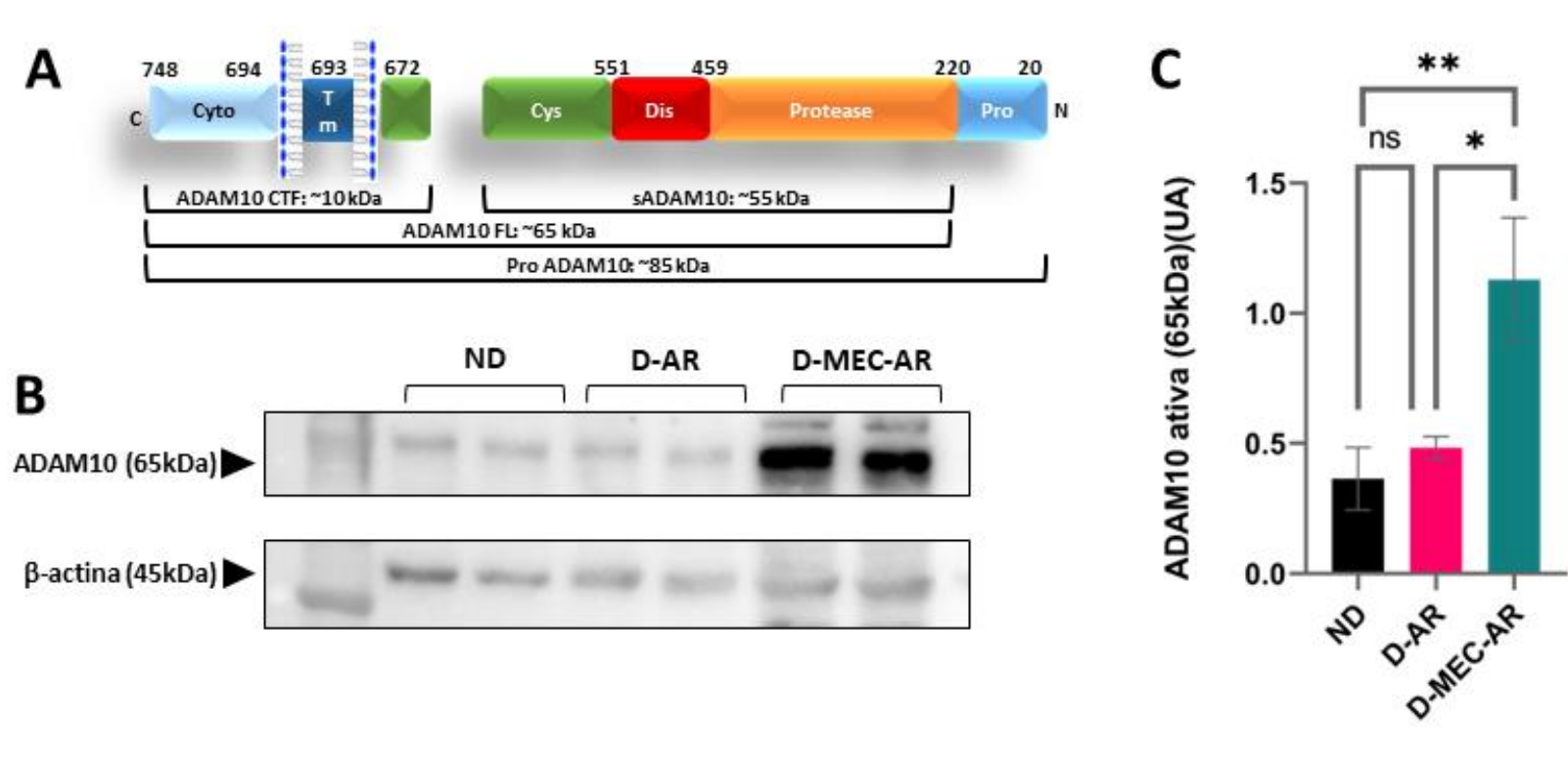


Figura 12. (A) Estrutura de multidomínios da ADAM10. Os números acima representam a sequência de aminoácidos. Abaixo encontram-se as massas moleculares de cada isoforma da proteína (em kDa). Extraído e modificado de (Peron, Vatanabe et al. 2018). (B) Membrana de *western blotting* mostrando os níveis de ADAM10 (65kDa) e β -actina (controle endógeno, 45kDa) em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y não diferenciadas (ND), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico (D-AR) e diferenciação pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC (D-MEC-AR). (C) Representação gráfica dos níveis de ADAM10 em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y nas mesmas condições. Teste estatístico ANOVA (ND vs D-MEC-AR $**p=0,0089$; D-AR vs D-MEC-AR $*p=0,0261$), ns = não significativo.

Nesse contexto, fica claro que para as células de neuroblastoma SH-SY5Y alcancem uma diferenciação e manutenção mais precisa em um modelo com MEC, não é necessário o uso de concentrações elevadas de fatores de crescimento. Isto é particularmente relevante, considerando que o estudo atual empregou uma MEC diluída, caracterizada pela presença de fatores de crescimento reduzidos. Mesmo diante desta configuração, o impacto nos níveis da ADAM10 foi observado, destacando a importância da interação entre as células e a MEC na regulação desta proteína.

4.3 Níveis da ADAM10 e IDE em células diferenciadas com e sem presença de MEC, cultivadas em meio hiperglicêmico

O presente estudo também avaliou o impacto do cultivo de células diferenciadas em meio hiperglicêmico nos níveis de ADAM10 e IDE, na tentativa de melhor compreender a relação entre DM2 e DA. Após o processo de diferenciação as células foram cultivadas em meio DMEM-F12 *advanced* tornado hiperglicêmico pela adição de 55 mM de glicose e 2 mM de glucosamina e menor concentração de FBS (1%), com a finalidade de reproduzir um modelo neuronal *in vitro* que mimetizasse um ambiente hiperglicêmico, semelhante ao que ocorre na DM2 (Lama, Pirozzi et al. 2022).

As células ND e as diferenciadas com AR, na ausência ou presença de MEC, e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-AR-H e D-MEC-AR-H, respectivamente) foram submetidas à avaliação das proteínas β 3-tubulina por *western blotting* (Figura 13A, B), bem como a imunomarcação da proteína NeuN (Figura 13C). Observou-se que as células diferenciadas com AR e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-AR-H) exibiram redução significativa nos níveis de β 3-tubulina e NeuN, quando comparadas às células cultivadas em meio normoglicêmico (D-AR). Em contrapartida, as células D-MEC-AR-H, embora tenham apresentado uma leve redução dos níveis de β 3-tubulina e NeuN, mantiveram um perfil mais robusto, com neuritos mais preservados e níveis mais elevados de NeuN e β 3-tubulina quando comparado às células D-AR-H. Apesar, desses resultados reforçarem a ideia previamente apresentada de que o protocolo que envolve a incorporação de MEC é mais eficaz na construção de um modelo *in vitro* para investigar doenças neurodegenerativas e metabólicas, foi possível observar que o meio hiperglicêmico interfere no processo de desdiferenciação.

A literatura aponta que o tratamento com meio hiperglicêmico pode ser um agente potencializador do processo de desdiferenciação (Gustafsson, Söderdahl et al. 2004). Por outro lado, não há estudos em células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas em

células semelhantes a neurônios com presença de MEC e cultivadas com meio hiperglicêmico que evidenciem que níveis elevados de glicose, simulando um meio hiperglicêmico como utilizado nesse estudo, induzem a desdiferenciação das células SH-SY5Y nessas condições. Nossos resultados reforçam esse pressuposto, no entanto, pesquisas destacam a hipótese de que a hipóxia também pode ter esse efeito (Löfstedt, Jögi et al. 2004, Edsjö, Holmquist et al. 2007).

Um estudo mostrou que as concentrações elevadas de glicose podem promover uma redução no número de neuritos nas células SH-SY5Y, sem presença de MEC, culminando em uma diminuição substancial de até 50% (Gustafsson, Söderdahl et al. 2004). O mecanismo biológico subjacente a desdiferenciação induzida pelo excesso de glicose pode estar associado à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Curiosamente, a presença de IGF-1 parece modular esse efeito, uma vez que regula positivamente a expressão da proteína de desacoplamento 3 (UCP3) que, por sua vez, limita a produção mitocondrial de ROS (Gustafsson, Söderdahl et al. 2004).

Desse modo, em meio à intrincada rede de interações envolvendo a glicose, o ambiente metabólico e os fatores de crescimento, é patente a necessidade de aprofundar investigações abrangentes a fim de desvelar os mecanismos subjacentes à desdiferenciação celular em contextos hiperglicêmicos. Ao almejar uma compreensão mais sólida dos modelos enriquecidos com MEC, notou-se que vários estudos convergem para um ponto de interesse em comum: as células SH-SY5Y exibem uma diferenciação mais eficaz quando cultivadas em substratos que incluem laminina e IGF-1, dois elementos presentes na constituição da MEC (Dwane, Durack et al. 2013, Shipley, Mangold et al. 2016).

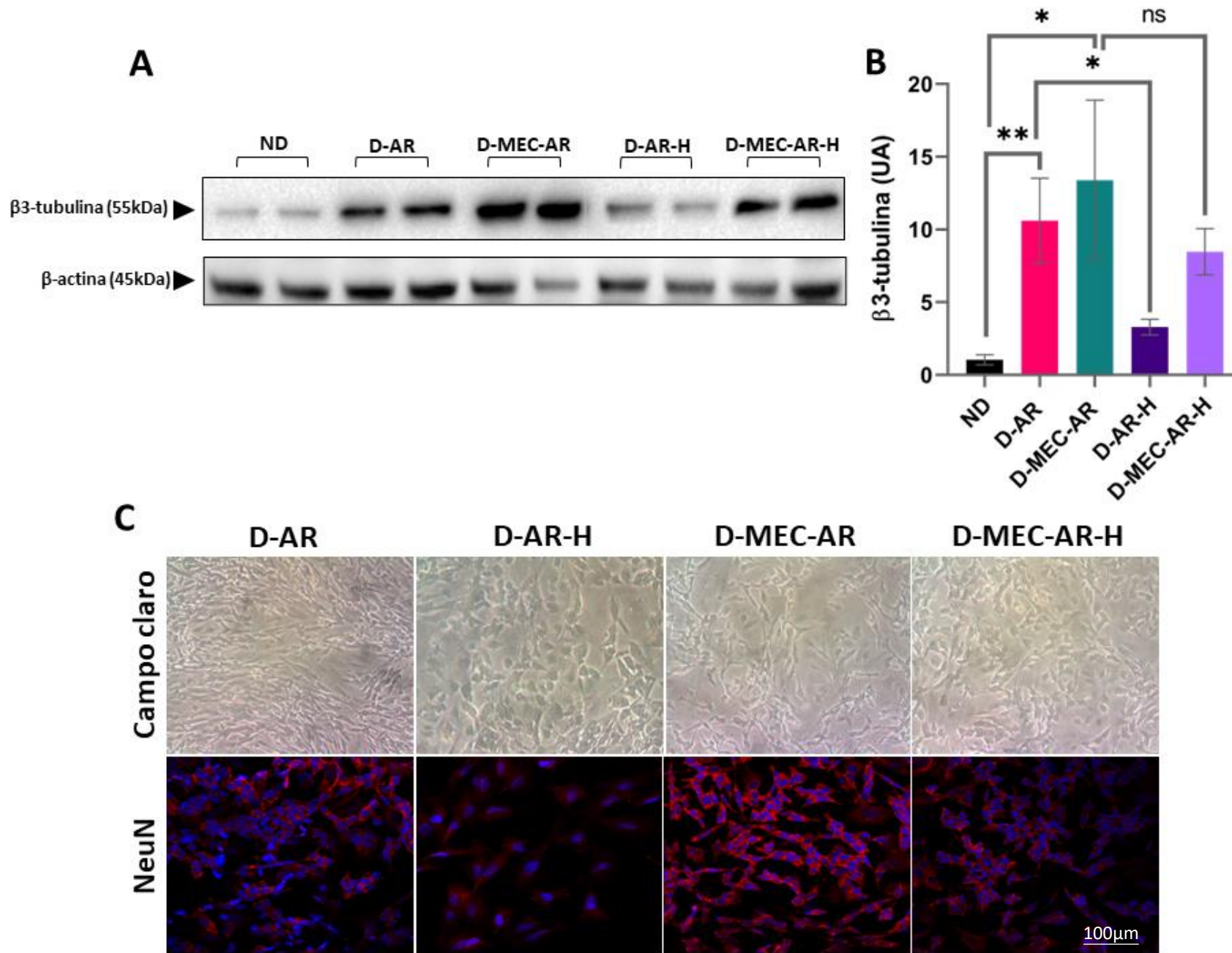


Figura 13. (A) Membrana de *western blotting* mostrando os níveis de $\beta 3$ -tubulina (55kDa) e β -actina (controle endógeno, 45kDa) em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y não diferenciadas (ND), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico (D-AR), diferenciação pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC (D-MEC-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-AR-H) e diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-MEC-AR-H). (B) Representação gráfica dos níveis de ADAM10 em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y nas mesmas condições. Teste estatístico Teste t (ND vs D-AR $**p=0,0035$; ND vs D-MEC-AR $*p=0,0349$; D-AR vs D-AR-H $*p=0,015$), ns = não significativo. (C) Células SH-SY5Y diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico (D-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC (D-MEC-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-AR-H) e diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-MEC-AR-H). As imagens de imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal Leica TCS SP8. As estruturas celulares marcadas em vermelho representam a NeuN e em azul o DAPI.

Notavelmente, a literatura carece de dados acerca dos efeitos do cultivo hiperglicêmico sobre as células diferenciadas, com o intuito de mimetizar um ambiente neuronal *in vitro* comprometido por distúrbios metabólicos. Nesse âmbito, o presente estudo propôs um novo modelo celular para o estudo destas condições. Além da avaliação das respostas celulares a esses contextos, este estudo também explorou os níveis de proteínas correlacionadas com a DA e as vias da insulina.

Realizamos também a avaliação dos níveis de ADAM10 nas condições experimentais descritas no item 3.2 (Figura 8). Os resultados mostraram uma redução significativa nos níveis da ADAM10 (isoforma ativa 65kDa) nas células D-MEC-AR-H, quando comparadas às células D-MEC-AR (Figura 14A, B). Vale ressaltar que a ausência de diferenças significativas nos níveis de ADAM10 entre as células ND, D-AR e as D-AR-H reforça a hipótese inicial sobre a importância da presença da MEC para obtenção de resultados positivos capazes de avaliar a interação intrincada entre DA e DM2.

Os achados de diminuição dos níveis de ADAM10 ativa nas células D-MEC-AR-H corroboram com alguns achados da literatura. Apesar da inexistência de outros trabalhos que avaliaram as condições deste estudo, relevantes achados mostraram que os níveis séricos de ADAM10 (que corresponde à isoforma inativa de 55 kDa) em indivíduos com DM2 encontram-se aumentados, particularmente sendo observados níveis mais elevados naqueles submetidos à insulino terapia (Lam, Shiu et al. 2022). A conexão estabelecida entre os níveis aumentados de ADAM10 sérica, glicemia e insulino terapia ressalta a potencial influência desses fatores e demonstra a complexidade da inter-relação das vias metabólicas e neurodegenerativas subjacentes (Zhang, Yin et al. 2015, Lam, Shiu et al. 2022). Esses achados também contribuem para o entendimento das implicações clínicas e fisiopatológicas sobre os níveis da ADAM10, reforçando a importância de abordagens interdisciplinares para desvendar a complexidade dos distúrbios neuro-metabólicos. A relação entre as isoformas ativa (plaqueta e neurônios) e inativa (plasma, soro, LCR) da ADAM10 desempenha um papel importante nas vias de processamento da APP, que têm implicações significativas na patogênese da DA. Quando os níveis de ADAM10 ativa estão elevados, observa-se um aumento na clivagem da APP pela via não-amiloidogênica. Em contrapartida, quando os níveis de ADAM10 ativa estão diminuídos, os níveis de ADAM10 solúvel e inativa aumentam, impactando negativamente a clivagem da APP pela via não-amiloidogênica (Pereira Vatanabe, Peron et al. 2021).

A ressonância desses resultados com a hipótese estabelecida consolida ainda mais o valor intrínseco desse modelo, proporcionando um modelo robusto e direcionado para a investigação dessa interação complexa entre doenças de base neurodegenerativa e metabólica.

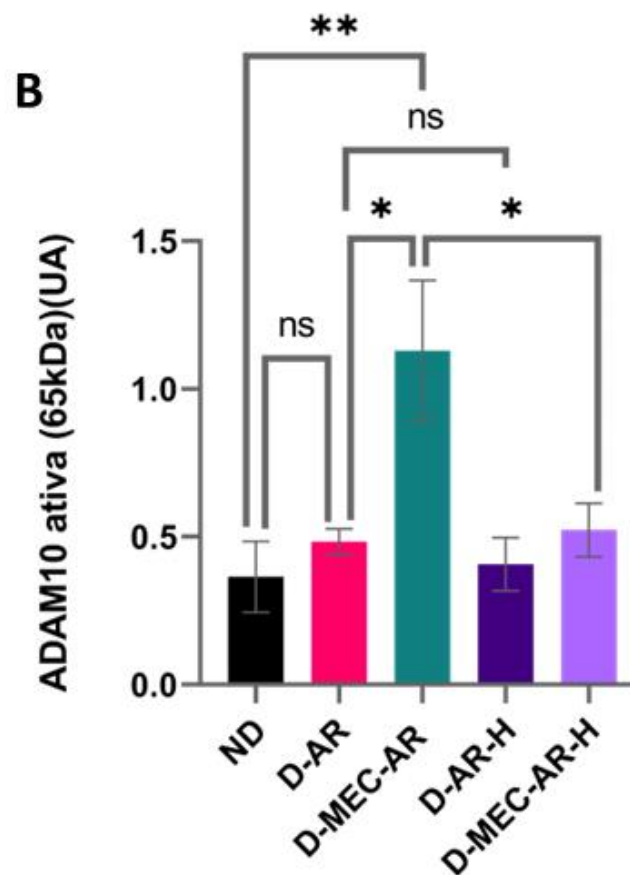
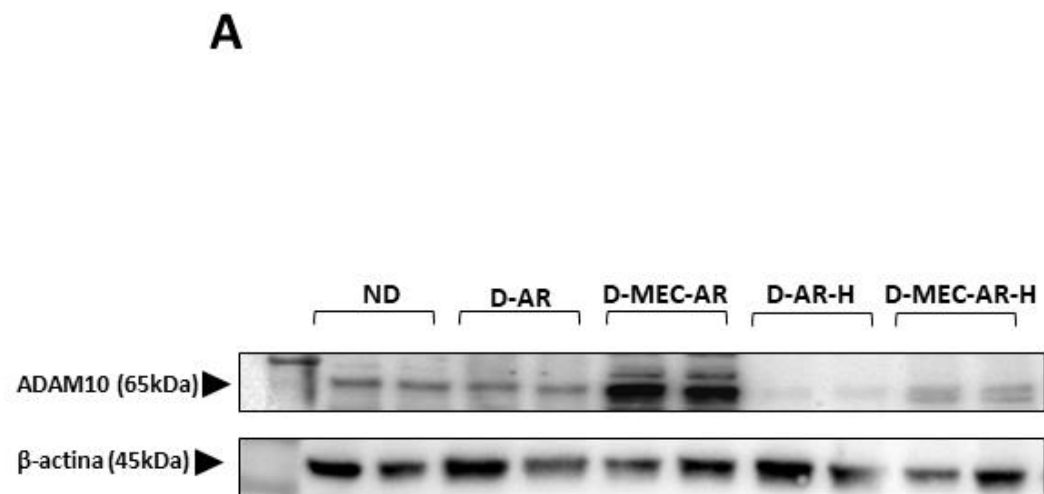


Figura 14. (A) Membrana de western blotting mostrando os níveis de ADAM10 (65kDa) e β -actina (controle endógeno, 45kDa) em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y não diferenciadas (ND), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico (D-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC (D-MEC-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-AR-H) e diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-MEC-AR-H). (B) Representação gráfica dos níveis de ADAM10 em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y nas mesmas condições. Teste estatístico ANOVA (ND vs D-MEC-AR $**p=0,0040$; D-AR vs D-MEC-AR $*p=0,0179$; D-MEC-AR vs D-MEC-AR-H $*p=0,0399$), ns = não significativo.

A sinalização da insulina é um complexo sistema de comunicação celular que desempenha um papel central na regulação dos níveis de glicose no sangue e no controle do metabolismo. Em meio a essa complexidade, algumas proteínas surgem como protagonistas essenciais, com papéis que se estendem além das fronteiras da regulação glicêmica. Uma dessas proteínas que merece destaque na via de sinalização da insulina é a IDE, uma peça-chave na regulação dos níveis de insulina, mas que vai além, desempenhando um papel crítico na degradação dos peptídeos A β , potencialmente impedindo seu acúmulo e subsequente formação de placas amiloides (Chami, Steel et al. 2016).

Assim, a IDE surge não apenas como uma reguladora vital da homeostase glicêmica, mas também como protagonista na prevenção do acúmulo prejudicial de peptídeo A β e, por consequência, na potencial modulação do desenvolvimento da DA (Chami, Steel et al. 2016). Nesse contexto, este estudo explorou a intersecção entre a IDE, a sinalização da insulina e o processo patológico da DA, destacando as possíveis interações que moldam a compreensão dessas importantes vias biológicas e suas implicações na saúde humana.

O presente estudo encontrou níveis reduzidos de IDE nas células D-MEC-AR-H em comparação com as células D-MEC-AR (Figura 15A, B), corroborando a correlação já estabelecida na literatura. A interligação entre o ambiente hiperglicêmico e a diminuição dos níveis da IDE reforça a conexão entre DM2 e a DA. É notável que a DM2 influencia negativamente a expressão da IDE, e essa correlação é aumentada pelo fato de que tanto pacientes com DM2 quanto com DA exibem alterações metabólicas e alterações cognitivas (Li, Wu et al. 2018).

A regulação negativa de IDE foi observada em estudos com pacientes com DA e DM2, indicando um papel potencialmente significativo dessa enzima nas interações entre os dois distúrbios (Li, Wu et al. 2018). No entanto, os autores do estudo, após verificarem a regulação negativa de IDE nos camundongos com DA e DM2, observaram que intervenções farmacológicas foram capazes de restaurar os níveis de expressão de IDE resultando na redução do acúmulo de A β 40 e A β 42, bem como na melhora dos déficits cognitivos (Li, Wu et al. 2018). Esses achados enfatizam o papel da IDE como um possível alvo terapêutico em pacientes com DA que também apresentam disfunções metabólicas, apontando para a complexa interação entre essas doenças e destacando a importância de futuras investigações nessa área.

Além disso, outro estudo mostrou que a diminuição dos níveis de IDE está associada ao aumento dos níveis de α -sinucleína (α -syn) em ilhotas de pessoas com DM2 e que o aumento da expressão da α -syn em células β de camundongos normais prejudica a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) (Steneberg, Bernardo et al. 2013). Assim, esses dados sugerem que a IDE é fator de risco para DM2, causando diminuição da GSIS e redução da autofagia por meio da supressão prejudicada dos níveis de α -syn nas células β (Steneberg, Bernardo et al. 2013).

Adicionalmente, a IDE desempenha um papel importante na relação entre a α -syn e a DA, assim como na degradação do peptídeo A β . De forma não proteolítica, a IDE interage com os oligômeros de α -syn, formando complexos estáveis e irreversíveis que inibem a formação de A β (Steneberg, Bernardo et al. 2013, González-Casimiro, Merino et al. 2021). A interação entre essas duas proteínas envolve atração eletrostática, com a região de exsítio positivamente carregada de IDE interagindo com o terminal C da α -syn, que contém muitos aminoácidos carregados negativamente. Essa interação é fundamental para a prevenção da formação de A β tóxico (Steneberg, Bernardo et al. 2013, González-Casimiro, Merino et al. 2021).

Em humanos, a expressão e/ou atividade reduzida de IDE pode causar níveis aumentados de oligômeros de polipeptídeo amiloide de ilhotas (PPAI) e, com o tempo, levar à formação de depósitos amiloides de PPAI e à destruição de células β (Steneberg, Bernardo et al. 2013). A autofagia é importante para a degradação seletiva de proteínas acumuladas e agregadas, às vezes chamada de agrefagia (Steneberg, Bernardo et al. 2013). Assim, independentemente da expressão ou atividade de IDE, as condições que levam à redução da autofagia nas células β levam ao aumento dos níveis intracelulares não apenas de α -sinucleína, mas também agregação dos oligômeros de PPAI e conseqüentemente, à formação de amiloide em células β humana (Steneberg, Bernardo et al. 2013). Ainda, em um estudo com animais, foi observado intolerância à glicose e hiperinsulinemia, sugerindo que esses fenômenos pudessem ser atribuídos à redução na degradação da insulina e ao desenvolvimento de resistência à insulina (Steneberg, Bernardo et al. 2013).

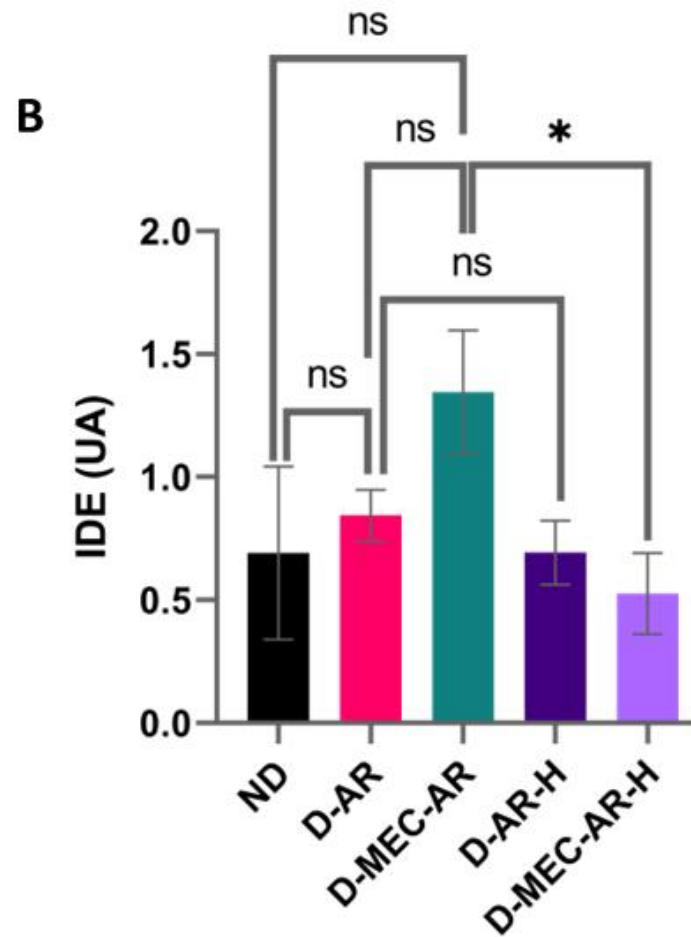
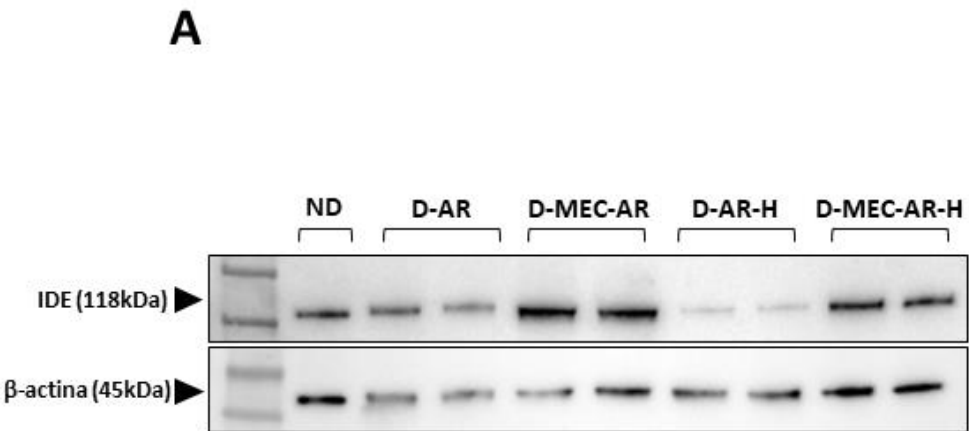


Figura 15. (A) Membrana de western blotting mostrando os níveis de IDE (118-120kDa) e β -actina (controle endógeno, 45kDa) em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y não diferenciadas (ND), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico (D-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC (D-MEC-AR), diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-AR-H) e diferenciadas pelo tratamento de ácido retinóico, na presença de MEC e cultivadas em meio hiperglicêmico (D-MEC-AR-H). (B) Representação gráfica dos níveis de IDE em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y nas mesmas condições. Teste estatístico ANOVA (D-MEC-AR vs D-MEC-AR-H * $p=0,0179$), ns = não significativo.

Embora os resultados obtidos em relação aos níveis de IDE possam parecer contraditórios em relação ao exposto pela literatura, a redução de seus níveis em um ambiente hiperglicêmico levanta questões intrigantes, já que poderia levar ao aumento no acúmulo de placas amiloides. Essa hipótese encontra suporte nos demais resultados deste mesmo estudo, que também identificou níveis reduzidos de ADAM10 ativa (65kDa) em ambiente hiperglicêmico. Essas descobertas sugerem que o ambiente hiperglicêmico pode levar tanto a redução da ADAM10 ativa como também à redução dos níveis de IDE contribuir assim para o acúmulo do A β e por consequência, das placas amiloides. No entanto, é importante destacar que essa relação complexa requer mais investigação para uma compreensão completa de seu impacto na DA.

5. CONCLUSÕES

De modo conciso, este estudo fornece dados importantes sobre a dinâmica de diferenciação e desdiferenciação das células SH-SY5Y em um ambiente hiperglicêmico, bem como o papel da MEC na provável manutenção da diferenciação neuronal. Observou-se uma rápida desdiferenciação das células após o tratamento exclusivo com AR, evidenciada pela diminuição dos comprimentos dos neuritos e pela redução significativa dos níveis de β 3-tubulina no décimo dia pós-tratamento. A inclusão da MEC nesse protocolo de diferenciação demonstrou ser essencial para manter o estado de diferenciação das células, conforme indicado pela preservação dos neuritos e níveis elevados de β 3-tubulina, mesmo após a retirada do AR.

Além disso, este estudo mostrou que a presença de MEC influenciou significativamente os níveis de ADAM10. Esse resultado sugere que a MEC pode ser um fator chave na regulação da atividade de ADAM10, e por extensão, na produção de peptídeos A β . A relação entre o DM2 e a DA também foi explorada, com resultados que indicam uma possível relação entre a redução dos níveis de IDE e de ADAM10 ativa (65kDa) e o ambiente hiperglicêmico. Isso auxilia no fortalecimento da provável conexão entre o DM2 e a DA, já que ambos os distúrbios compartilham alterações metabólicas e cognitivas.

Em resumo, os resultados deste estudo destacam a importância da MEC na manutenção da diferenciação neuronal *in vitro* e sugere que a MEC pode desempenhar um papel relevante na regulação da proteína ADAM10. Além disso, a conexão entre DM2, IDE, ADAM10 e DA aponta para uma relação complexa entre esses distúrbios metabólicos e neurodegenerativos. Esses resultados contribuem para uma compreensão

mais profunda das interações moleculares subjacentes à DA, oferecendo importantes *insights* para futuras investigações a respeito dessas temáticas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aprimoramento do modelo *in vitro* empregando células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas em células semelhantes a neurônios representa um passo significativo, pois o modelo *in vitro* desenvolvido revelou informações sobre a importância do uso de proteínas da MEC para aumentar o tempo de diferenciação das células.

Apesar dos avanços alcançados, é importante reconhecer as limitações deste estudo. A desdiferenciação prematura em culturas tratadas exclusivamente com AR ressaltou a necessidade contínua de aprimoramentos nos modelos de cultura que melhor representem as respostas humanas. Além disso, embora os resultados forneçam dados importantes sobre a regulação da ADAM10 em um contexto de MEC rica em laminina, a complexidade das vias de sinalização e interações celulares indica que outros mecanismos podem estar envolvidos. Assim, a avaliação de apenas uma proteína da via de sinalização de insulina (IDE) não é capaz de demonstrar os detalhes da relação entre DM2 e DA, sendo que diversas outras proteínas precisam ser investigadas. Isso proporcionaria ao estudo uma análise mais aprofundada sobre vias de sinalização específicas que mediam os efeitos da MEC e do ambiente hiperglicêmico na expressão da ADAM10. Essa análise mais aprofundada poderia revelar alvos terapêuticos mais específicos e potencialmente auxiliar na construção de estratégias de tratamento para doenças neurodegenerativas, em especial a DA.

Vale destacar que o título inicialmente propunha a avaliação não somente dos níveis, mas também da atividade da ADAM10, porém, devido a problemas técnicos e à falta de material adequado, essa análise não pôde ser realizada, o que resalta a necessidade de futuras investigações para essa questão.

Ainda assim, o desenvolvimento de um modelo *in vitro* que envolveu a diferenciação celular, a implementação da MEC e a análise de algumas vias de sinalização ofereceu um contexto mais próximo da realidade biológica, permitindo a observação da relação direta entre a exposição ao ambiente hiperglicêmico e a expressão de proteínas envolvidas na patogênese da DA. Além disso, devido ao efeito da IDE sobre o A β , esse estudo revelou um achado significativo, demonstrando que em ambientes hiperglicêmicos a IDE pode apresentar seus níveis diminuídos, sugerindo que a regulação da glicose no

sangue e o funcionamento adequado da IDE podem estar interligados na prevenção do acúmulo de A β , fornecendo importantes bases para futuras investigações.

Em resumo, este estudo foi um passo inicial para desvendar alguns mecanismos *in vitro* associados com a DA e DM2, bem como ao explorar as influências da MEC e do ambiente metabólico nessas condições. Estes resultados pavimentam o caminho para futuros estudos sobre as complexas interações entre essas duas doenças.

7 REFERÊNCIAS

- Agholme, L., T. Lindström, K. Kågedal, J. Marcusson and M. Hallbeck (2010). "An *in vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons." *J Alzheimers Dis* 20(4): 1069-1082.
- Albert, M. S., S. T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H. H. Feldman, N. C. Fox, A. Gamst, D. M. Holtzman, W. J. Jagust, R. C. Petersen, P. J. Snyder, M. C. Carrillo, B. Thies and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 7(3): 270-279.
- Ando, K., K. Uemura, A. Kuzuya, M. Maesako, M. Asada-Utsugi, M. Kubota, N. Aoyagi, K. Yoshioka, K. Okawa, H. Inoue, J. Kawamata, S. Shimohama, T. Arai, R. Takahashi and A. Kinoshita (2011). "N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease." *J Biol Chem* 286(9): 7619-7628.
- Bedse, G., F. Di Domenico, G. Serviddio and T. Cassano (2015). "Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge." *Front Neurosci* 9: 204.
- Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L. S. Freedman (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." *Cancer Res* 38(11 Pt 1): 3751-3757.
- Biessels, G. J. and L. P. Reagan (2015). "Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction." *Nat Rev Neurosci* 16(11): 660-671.
- Bleibaum, F., A. Sommer, M. Veit, B. Rabe, J. Andrä, K. Kunzelmann, C. Nehls, W. Correa, T. Gutschmann, J. Grötzinger, S. Bhakdi and K. Reiss (2019). "ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry." *J Mol Cell Biol* 11(11): 979-993.
- Breteler, M. M., F. A. van den Ouweland, D. E. Grobbee and A. Hofman (1992). "A community-based study of dementia: the Rotterdam Elderly Study." *Neuroepidemiology* 11 Suppl 1: 23-28.
- Chami, B., A. Steel, S. De La Monte and G. T. J. M. b. d. Sutherland (2016). "The rise and fall of insulin signaling in Alzheimer's disease." 31: 497-515.
- Cidades, I. (2018). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Constantinescu, R., A. T. Constantinescu, H. Reichmann and B. Janetzky (2007). "Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y." *J Neural Transm Suppl*(72): 17-28.
- Cui, P. J., L. Cao, Y. Wang, Y. L. Deng, W. Xu, G. Wang, Y. Zhang, L. Zheng, Q. Z. Fei, T. Zhang and S. D. Chen (2012). "The association between two single nucleotide polymorphisms within the insulin-degrading enzyme gene and Alzheimer's disease in a Chinese Han population." *J Clin Neurosci* 19(5): 745-749.

Culbert, A. A., S. D. Skaper, D. R. Howlett, N. A. Evans, L. Facci, P. E. Soden, Z. M. Seymour, F. Guillot, M. Gaestel and J. C. Richardson (2006). "MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease." *J Biol Chem* 281(33): 23658-23667.

Custodio, N., A. Wheelock, D. Thumala and A. Slachevsky (2017). "Dementia in Latin America: Epidemiological Evidence and Implications for Public Policy." *Front Aging Neurosci* 9: 221.

da Costa, I. B., R. W. de Labio, L. T. Rasmussen, G. A. Viani, E. Chen, J. Villares, G. Turecki, M. A. C. Smith and S. L. M. Payao (2017). "Change in INSR, APBA2 and IDE Gene Expressions in Brains of Alzheimer's Disease Patients." *Curr Alzheimer Res* 14(7): 760-765.

da Silva Santos, A. E. M., G. M. Senhorinha, D. T. Teodoro, F. F. Firmino, I. C. S. Braudes and L. S. J. E. A. s. S. e. N. de Lucena (2021). "O PAPEL DA SÍNDROME METABÓLICA NA DOENÇA DE ALZHEIMER." 1.

de Bruijn, R. F., M. J. Bos, M. L. Portegies, A. Hofman, O. H. Franco, P. J. Koudstaal and M. A. Ikram (2015). "The potential for prevention of dementia across two decades: the prospective, population-based Rotterdam Study." *BMC Med* 13: 132.

De Felice, F. G. and M. V. Lourenco (2015). "Brain metabolic stress and neuroinflammation at the basis of cognitive impairment in Alzheimer's disease." *Front Aging Neurosci* 7: 94.

De Felice, F. G. and M. V. J. F. i. a. n. Lourenco (2015). "Brain metabolic stress and neuroinflammation at the basis of cognitive impairment in Alzheimer's disease." 7: 94.

de Medeiros, L. M., M. A. De Bastiani, E. P. Rico, P. Schonhofen, B. Pfaffenseller, B. Wollenhaupt-Aguiar, L. Grun, F. Barbé-Tuana, E. R. Zimmer, M. A. A. Castro, R. B. Parsons and F. Klamt (2019). "Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies." *Mol Neurobiol* 56(11): 7355-7367.

de Quadros, E. B. and Â. G. J. S. e. S. e. A. Batista (2019). "INFLUENCIA DA RESISTENCIA A INSULINA NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER." 3.

Duan, W., Y.-P. Zhang, Z. Hou, C. Huang, H. Zhu, C.-Q. Zhang and Q. J. M. n. Yin (2016). "Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator." 53: 1637-1647.

Dwane, S., E. Durack and P. A. Kiely (2013). "Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration." *BMC Res Notes* 6: 366.

Edland, S. D., F. Wavrant-De Vriesé, D. Compton, G. E. Smith, R. Ivnik, B. F. Boeve, E. G. Tangalos and R. C. Petersen (2003). "Insulin degrading enzyme (IDE) genetic variants and risk of Alzheimer's disease: evidence of effect modification by apolipoprotein E (APOE)." *Neurosci Lett* 345(1): 21-24.

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

Encinas, M., M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Cena, C. Gallego and J. X. Comella (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* 75(3): 991-1003.

Ferreira, A. and A. J. J. o. n. r. Caceres (1992). "Expression of the Class III β -tubulin isotype in developing neurons in culture." 32(4): 516-529.

Ferreira, L. S., C. S. Fernandes, M. N. Vieira and F. G. J. F. i. n. De Felice (2018). "Insulin resistance in Alzheimer's disease." 830.

Flanagan, L. A., L. M. Rebaza, S. Derzic, P. H. Schwartz and E. S. J. J. o. n. r. Monuki (2006). "Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins." 83(5): 845-856.

Folch, J., M. Etcheto, O. Busquets, E. Sánchez-López, R. D. Castro-Torres, E. Verdager, P. R. Manzine, S. R. Poor, M. L. García, J. Olloquequi, C. Beas-Zarate, C. Auladell and A. Camins (2018). "The Implication of the Brain Insulin Receptor in Late Onset Alzheimer's Disease Dementia." *Pharmaceuticals (Basel)* 11(1).

Formiga, F. and M. Perez-Maraver (2014). "[Diabetes mellitus type 2 in the elderly. It is essential to know how to personalise the management]." *Med Clin (Barc)* 142(3): 114-115.

Forster, J., S. Köglberger, C. Trefois, O. Boyd, A. Baumuratov, L. Buck, R. Balling and P. J. J. o. b. s. Antony (2016). "Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability." 21(5): 496-509.

Freire, E., F. C. Gomes, R. Linden, V. M. Neto and T. J. J. o. c. s. Coelho-Sampaio (2002). "Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis." 115(24): 4867-4876.

Frölich, L., D. Blum-Degen, P. Riederer and S. Hoyer (1999). "A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 893: 290-293.

Gomes, M. A. C. (2015). O papel dos biomarcadores na doença de Alzheimer.

González-Casimiro, C. M., B. Merino, E. Casanueva-Álvarez, T. Postigo-Casado, P. Cámara-Torres, C. M. Fernández-Díaz, M. A. Leissring, I. Cózar-Castellano and G. Perdomo (2021). "Modulation of Insulin Sensitivity by Insulin-Degrading Enzyme." *Biomedicines* 9(1).

Gordon, J. and S. Amini (2021). "General Overview of Neuronal Cell Culture." *Methods Mol Biol* 2311: 1-8.

Grigoli, M. M. (2020). "Atividade e níveis da ADAM10 plasmática em indivíduos com transtorno neurocognitivo leve e doença de Alzheimer."

Guo, J., M. Qiang and R. F. J. B. r. Ludueña (2011). "The distribution of β -tubulin isoforms in cultured neurons from embryonic, newborn, and adult mouse brains." 1420: 8-18.

Gusel'Nikova, V. and D. J. A. N. Korzhhevskiy (2015). "NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker." 7(2 (25)): 42-47.

Gustafsson, H., T. Söderdahl, G. Jönsson, J. O. Bratteng and A. Forsby (2004). "Insulin-like growth factor type 1 prevents hyperglycemia-induced uncoupling protein 3 down-regulation and oxidative stress." *J Neurosci Res* 77(2): 285-291.

Hayden, M. R. J. B. s. (2019). "Type 2 diabetes mellitus increases the risk of late-onset Alzheimer's disease: ultrastructural remodeling of the neurovascular unit and diabetic gliopathy." 9(10): 262.

Hooper, N. M. and A. J. Turner (2002). "The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer s disease." *Curr Med Chem* 9(11): 1107-1119.

Hoyer, S. (2002). "The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review." *J Neural Transm (Vienna)* 109(7-8): 991-1002.

Hoyer, S. (2004). "Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease." *Eur J Pharmacol* 490(1-3): 115-125.

Jafferli, S., Y. Dumont, F. Sotty, Y. Robitaille, R. Quirion and S. Kar (2000). "Insulin-like growth factor-I and its receptor in the frontal cortex, hippocampus, and cerebellum of normal human and Alzheimer disease brains." *Synapse* 38(4): 450-459.

Kang, M. and Y. J. G. Yao (2022). "Laminin regulates oligodendrocyte development and myelination." *70(3)*: 414-429.

Kann, O. and R. Kovacs (2007). "Mitochondria and neuronal activity." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(2): C641-657.

Kato, Y., M. H. Kim and M. Kino-Oka (2018). "Comparison of growth kinetics between static and dynamic cultures of human induced pluripotent stem cells." *J Biosci Bioeng* 125(6): 736-740.

Khavinson, V., N. Linkova, E. Kozhevnikova and S. Trofimova (2020). "EDR Peptide: Possible Mechanism of Gene Expression and Protein Synthesis Regulation Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." *Molecules* 26(1).

Kim, E. K. and E. J. Choi (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." *Biochim Biophys Acta* 1802(4): 396-405.

Kovalevich, J., M. Santerre and D. Langford (2021). "Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology." *Methods Mol Biol* 2311: 9-23.

Kumar, A., J. Sidhu, A. Goyal and J. W. Tsao (2018). "Alzheimer disease."

Kumar, A. and J. Tsao (2018). "Alzheimer Disease StatPearls: Treasure Island (FL)."

Kurochkin, I. V. and S. Goto (1994). "Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme." *FEBS Lett* 345(1): 33-37.

Lam, S., S. W. Shiu, Y. Wong and K. C. Tan (2022). "Effect of type 2 diabetes on A disintegrin and metalloprotease 10." *J Diabetes* 14(6): 394-400.

Lama, A., C. Pirozzi, I. Severi, M. G. Morgese, M. Senzacqua, C. Annunziata, F. Comella, F. Del Piano, S. Schiavone, S. Petrosino, M. P. Mollica, S. Diano, L. Trabace, A. Calignano, A. Giordano, G. Mattace Raso and R. Meli (2022). "Palmitoylethanolamide dampens neuroinflammation and anxiety-like behavior in obese mice." *Brain Behav Immun* 102: 110-123.

Li, H., J. Wu, L. Zhu, L. Sha, S. Yang, J. Wei, L. Ji, X. Tang, K. Mao, L. Cao, N. Wei, W. Xie and Z. Yang (2018). "Insulin degrading enzyme contributes to the pathology in a mixed model of Type 2 diabetes and Alzheimer's disease: possible mechanisms of IDE in T2D and AD." *Biosci Rep* 38(1).

Li, Z.-F., L. Cui, M.-M. Jin, D.-Y. Hu, X.-G. Hou, S.-S. Liu, X. Zhang, J.-H. J. D. M. Zhu and Mechanisms (2022). "A Matrigel-based 3D construct of SH-SY5Y cells models the α -synuclein pathologies of Parkinson's disease." *15(3)*: dmm049125.

Livingston, G., J. Huntley, A. Sommerlad, D. Ames, C. Ballard, S. Banerjee, C. Brayne, A. Burns, J. Cohen-Mansfield, C. Cooper, S. G. Costafreda, A. Dias, N. Fox, L. N. Gitlin, R. Howard, H. C. Kales, M. Kivimaki, E. B. Larson, A. Ogunniyi, V. Orgeta, K. Ritchie, K. Rockwood, E. L. Sampson, Q. Samus, L. S. Schneider, G. Selbaek, L. Teri and N. Mukadam (2020). "Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission." *Lancet* 396(10248): 413-446.

Livingston, G., A. Sommerlad, V. Orgeta, S. G. Costafreda, J. Huntley, D. Ames, C. Ballard, S. Banerjee, A. Burns, J. Cohen-Mansfield, C. Cooper, N. Fox, L. N. Gitlin, R. Howard, H. C. Kales, E. B. Larson, K. Ritchie, K. Rockwood, E. L. Sampson, Q. Samus, L. S. Schneider, G. Selbaek, L. Teri and N. Mukadam (2017). "Dementia prevention, intervention, and care." *Lancet* 390(10113): 2673-2734.

Löfstedt, T., A. Jögi, M. Sigvardsson, K. Gradin, L. Poellinger, S. Pålman and H. Axelson (2004). "Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells." *J Biol Chem* 279(38): 39223-39231.

Lopes, F. M., R. Schröder, M. L. da Frota, Jr., A. Zanotto-Filho, C. B. Müller, A. S. Pires, R. T. Meurer, G. D. Colpo, D. P. Gelain, F. Kapczynski, J. C. Moreira, C. Fernandes Mda and F. Klamt (2010). "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies." *Brain Res* 1337: 85-94.

Ma, W., T. Tavakoli, E. Derby, Y. Serebryakova, M. S. Rao and M. P. J. B. d. b. Mattson (2008). "Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells." *8*(1): 1-13.

Manzine, P. R., E. J. Barham, F. A. Vale, H. S. Selistre-de-Araújo, S. C. Pavarini and M. R. Cominetti (2014). "Platelet a disintegrin and metalloproteinase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry* 29(4): 414-420.

Manzine, P. R., J. M. de França Bram, E. J. Barham, A. do Vale Fde, H. S. Selistre-de-Araújo, M. R. Cominetti and S. C. Iost Pavarini (2013). "ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: a study with Brazilian elderly." *Dement Geriatr Cogn Disord* 35(1-2): 58-66.

Manzine, P. R., I. P. Vatanabe, M. M. Grigoli, R. V. Pedroso, M. P. A. Monteiro, D. S. Oliveira, C. Nascimento, R. Peron, F. S. Orlandi and M. R. J. C. P. D. Cominetti (2022). "Potential Protein Blood-based Biomarkers in Different Types of Dementia: A Therapeutic Overview." *28*(14): 1170-1186.

Manzine, P. R., I. P. Vatanabe, R. Peron, M. M. Grigoli, R. V. Pedroso, C. M. C. Nascimento and M. R. Cominetti (2020). "Blood-based Biomarkers of Alzheimer's Disease: The Long and Winding Road." *Curr Pharm Des* 26(12): 1300-1315.

Maretzky, T., A. Evers, S. Le Gall, R. O. Alabi, N. Speck, K. Reiss and C. P. J. J. o. B. C. Blobel (2015). "The cytoplasmic domain of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) regulates its constitutive activity but is dispensable for stimulated ADAM10-dependent shedding." *290*(12): 7416-7425.

Maurer, K. and S. Hoyer (2006). "Alois Alzheimer revisited: differences in origin of the disease carrying his name." *J Neural Transm (Vienna)* 113(11): 1645-1658.

McNay, E. C. and J. Pearson-Leary (2020). "GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance." *Exp Neurol* 323: 113076.

Min, Z., Y. Tang, X.-T. Hu, B.-L. Zhu, Y.-L. Ma, J.-S. Zha, X.-J. Deng, Z. Yan and G.-J. J. F. i. M. N. Chen (2018). "Cosmosiin increases ADAM10 expression via mechanisms involving 5'UTR and PI3K signaling." *11*: 198.

Oharazawa, H., N. Ibaraki, L. R. Lin and V. N. Reddy (1999). "The effects of extracellular matrix on cell attachment, proliferation and migration in a human lens epithelial cell line." *Exp Eye Res* 69(6): 603-610.

Oliveira Monteiro, E. P. d. A. M. P., R. Valle Pedroso, M. Mantellatto Grigoli, T. Vicente Silva, P. R. Manzine and M. R. Cominetti (2023). "ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: A systematic review." *Rev Neurol (Paris)*.

Pemberton, K., B. Mersman and F. Xu (2018). "Using ImageJ to Assess Neurite Outgrowth in Mammalian Cell Cultures: Research Data Quantification Exercises in Undergraduate Neuroscience Lab." *J Undergrad Neurosci Educ* 16(2): A186-a194.

Pereira Vatanabe, I., R. Peron, M. Mantellatto Grigoli, S. Pelucchi, G. De Cesare, T. Magalhaes, P. R. Manzine, M. L. Figueredo Balthazar, M. Di Luca, E. Marcello and M. R. Cominetti (2021). "ADAM10 Plasma and CSF Levels Are Increased in Mild Alzheimer's Disease." *Int J Mol Sci* 22(5).

Pereira Vatanabe, I., R. Peron, M. Mantellatto Grigoli, S. Pelucchi, G. De Cesare, T. Magalhães, P. R. Manzine, M. L. Figueredo Balthazar, M. Di Luca and E. J. I. j. o. m. s. Marcello (2021). "ADAM10 plasma and CSF levels are increased in mild Alzheimer's disease." *22*(5): 2416.

Peron, R., I. P. Vatanabe, P. R. Manzine, A. Camins and M. R. Cominetti (2018). "Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment." *Pharmaceuticals (Basel)* 11(1).

Petersen, R. C. and J. C. J. A. o. n. Morris (2005). "Mild cognitive impairment as a clinical entity and treatment target." *62(7)*: 1160-1163.

Petersen, R. C., G. E. Smith, S. C. Waring, R. J. Ivnik, E. G. Tangalos and E. J. A. o. n. Kokmen (1999). "Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome." *56(3)*: 303-308.

Qiu, C. and L. Fratiglioni (2018). "Aging without Dementia is Achievable: Current Evidence from Epidemiological Research." *J Alzheimers Dis* 62(3): 933-942.

Quevedo, J. (2019). *Emergências Psiquiátricas-4*, Artmed Editora.

Rodriguez-Rodriguez, P., A. Sandebring-Matton, P. Merino-Serrais, C. Parrado-Fernandez, A. Rabano, B. Winblad, J. Ávila, I. Ferrer and A. Cedazo-Minguez (2017). "Tau hyperphosphorylation induces oligomeric insulin accumulation and insulin resistance in neurons." *Brain* 140(12): 3269-3285.

Ross, R. A., B. A. Spengler and J. L. Biedler (1983). "Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells." *J Natl Cancer Inst* 71(4): 741-747.

Saftig, P. and S. F. Lichtenthaler (2015). "The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain." *Prog Neurobiol* 135: 1-20.

Scherer, S. S. J. T. J. o. c. b. (2002). "Myelination: some receptors required." *156(1)*: 13.

Schlie-Wolter, S., A. Ngezahayo and B. N. J. E. c. r. Chichkov (2013). "The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro." *319(10)*: 1553-1561.

Schnöder, L., W. Hao, Y. Qin, S. Liu, I. Tomic, X. Liu, K. Fassbender and Y. Liu (2016). "Deficiency of Neuronal p38 α MAPK Attenuates Amyloid Pathology in Alzheimer Disease Mouse and Cell Models through Facilitating Lysosomal Degradation of BACE1." *J Biol Chem* 291(5): 2067-2079.

Schubert, M., D. Gautam, D. Surjo, K. Ueki, S. Baudler, D. Schubert, T. Kondo, J. Alber, N. Galldiks, E. Küstermann, S. Arndt, A. H. Jacobs, W. Krone, C. R. Kahn and J. C. Brüning (2004). "Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 3100-3105.

Seegar, T. C., L. B. Killingsworth, N. Saha, P. A. Meyer, D. Patra, B. Zimmerman, P. W. Janes, E. Rubinstein, D. B. Nikolov and G. J. C. Skiniotis (2017). "Structural basis for regulated proteolysis by the α -secretase ADAM10." *171(7)*: 1638-1648. e1637.

Shinohara, M. and N. Sato (2017). "Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease." *Neurochem Int* 108: 296-302.

Shiple, M. M., C. A. Mangold and M. L. J. J. Szpara (2016). "Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line." (108): e53193.

Silva, E. G. d. (2016). "Aumento de IGF-1 sérico em pacientes com transtorno bipolar."

Sims-Robinson, C., B. Kim, A. Rosko and E. L. J. N. R. N. Feldman (2010). "How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology?" *6(10)*: 551-559.

Steneberg, P., L. Bernardo, S. Edfalk, L. Lundberg, F. Backlund, C. G. Ostenson and H. Edlund (2013). "The type 2 diabetes-associated gene *ide* is required for insulin secretion and suppression of α -synuclein levels in β -cells." *Diabetes* 62(6): 2004-2014.

Suemoto, C. K., N. Mukadam, S. M. D. Brucki, P. Caramelli, R. Nitrini, J. Laks, G. Livingston and C. P. Ferri (2023). "Risk factors for dementia in Brazil: Differences by region and race." *Alzheimers Dement* 19(5): 1849-1857.

Szybińska, A., W. J. A. Leśniak and disease (2017). "P53 dysfunction in neurodegenerative diseases-the cause or effect of pathological changes?" *8(4)*: 506.

Takizawa, M., T. Arimori, Y. Taniguchi, Y. Kitago, E. Yamashita, J. Takagi and K. Sekiguchi (2017). "Mechanistic basis for the recognition of laminin-511 by $\alpha 6\beta 1$ integrin." *Sci Adv* 3(9): e1701497.

Tippmann, F., J. Hundt, A. Schneider, K. Endres and F. Fahrenholz (2009). "Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin." *FASEB J* 23(6): 1643-1654.

Tsai, Y.-H., K. L. VanDussen, E. T. Sawey, A. W. Wade, C. Kasper, S. Rakshit, R. G. Bhatt, A. Stoeck, I. Maillard and H. C. J. G. Crawford (2014). "ADAM10 regulates Notch function in intestinal stem cells of mice." *147*(4): 822-834. e813.

Vatanabe, I. P. (2020). "ADAM10 como biomarcadora de Transtorno Neurocognitivo Leve."

Vepsäläinen, S., M. Parkinson, S. Helisalmi, A. Mannermaa, H. Soininen, R. E. Tanzi, L. Bertram and M. Hiltunen (2007). "Insulin-degrading enzyme is genetically associated with Alzheimer's disease in the Finnish population." *J Med Genet* 44(9): 606-608.

Wan, X. Z., B. Li, Y. C. Li, X. L. Yang, W. Zhang, L. Zhong and S. J. Tang (2012). "Activation of NMDA receptors upregulates a disintegrin and metalloproteinase 10 via a Wnt/MAPK signaling pathway." *J Neurosci* 32(11): 3910-3916.

Weller, J. and A. Budson (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. F1000Research.

Wu, M., B. Wang, J. Fei, N. Santanam and E. R. Blough (2010). "Important roles of Akt/PKB signaling in the aging process." *Front Biosci (Schol Ed)* 2(3): 1169-1188.

Yarchoan, M., J. B. Toledo, E. B. Lee, Z. Arvanitakis, H. Kazi, L.-Y. Han, N. Louneva, V. M.-Y. Lee, S. F. Kim and J. Q. J. A. n. Trojanowski (2014). "Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies." *128*: 679-689.

Zhang, Y., F. Yin, J. Liu, Z. Liu, L. Guo, Z. Xia and J. Zidichouski (2015). "Geniposide attenuates insulin-deficiency-induced acceleration of β -amyloidosis in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease." *Neurochem Int* 89: 7-16.

Zhao, J., X. Liu, W. Xia, Y. Zhang and C. Wang (2020). "Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease." *Front Mol Neurosci* 13: 137.

Zhao, W., H. Chen, H. Xu, E. Moore, N. Meiri, M. J. Quon and D. L. Alkon (1999). "Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats." *J Biol Chem* 274(49): 34893-34902.

Zhao, X. and A. J. T. A. J. o. H. G. Bhattacharyya (2018). "Human models are needed for studying human neurodevelopmental disorders." *103*(6): 829-857.