



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO E ARTES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeitos do Álcool em Células Neuronais Humanas:
Avaliação Citotóxica do Etanol em *SH-SY5Y*

Amanda Caroline da Silva Santos

São José dos Campos/SP

2025





UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO E ARTES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Efeitos do Álcool em Células Neurais Humanas:

Avaliação Citotóxica do Etanol em *SH-SY5Y*

Amanda Caroline da Silva Santos

Relatório Final apresentado como parte das exigências da disciplina Trabalho de Graduação à Banca Examinadora da Faculdade de Educação e Artes da Universidade do Vale do Paraíba.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos/SP

2025



Universidade do Vale do Paraíba
Faculdade de Educação e Artes

Curso de Ciências Biológicas
Da Faculdade de Educação e Artes

TRABALHO DE GRADUAÇÃO

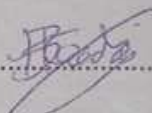
Título: Efeitos do Álcool em Células Neuronais Humanas: Avaliação Citotóxica do Etanol em SH-SY5Y.

Aluna: Amanda Caroline da Silva Santos

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Cristina Pacheco Soares

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Bruno Henrique Godoi


.....

Prof. Me. Matheus Salgado de Oliveira


.....

Nota do Trabalho: 9,5

São José dos Campos - SP
2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder força, sabedoria e coragem para chegar até aqui. Sem Sua presença e direção, nada disso seria possível.

Agradeço à minha família, pelo amor incondicional, pelo apoio em todos os momentos e pela compreensão nas horas em que precisei me dedicar integralmente a este trabalho. Cada palavra de incentivo e gesto de carinho foram fundamentais para que eu não desistisse.

À minha orientadora, Cristina Pacheco Soares, pela paciência, disponibilidade e por compartilhar seus conhecimentos com tanta dedicação. Seu acompanhamento foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

E, por fim, agradeço aos meus amigos da faculdade, que tornaram essa caminhada mais leve e divertida. Pelas risadas e pelo companheirismo em cada etapa, meu sincero obrigado, vocês tornaram essa jornada inesquecível.

RESUMO

O consumo de álcool é um fator de risco significativo para diversas doenças neurodegenerativas, sendo sua toxicidade um tema relevante na pesquisa biológica. Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos do etanol em células da linhagem *SH-SY5Y*, um modelo amplamente utilizado para estudos de neurobiologia. Como muitas linhagens celulares derivadas de tumores, a *SH-SY5Y* é intrinsecamente heterogênea, exibindo características tanto de células progenitoras quanto de células diferenciadas. Para abordar essa limitação, pesquisadores frequentemente implementam protocolos de diferenciação que induzem a maturação das células *SH-SY5Y*, promovendo sua transição para um fenótipo mais desenvolvido e funcionalmente comparável ao neuronal. Um dos métodos mais comumente usados e bem caracterizados para indução de diferenciação em células *SH-SY5Y* é a adição de ácido retinoico (AR) ao meio de cultura, um derivado da vitamina A. Com o intuito de analisar a toxicidade do etanol sobre o sistema nervoso humano, as células foram expostas a diferentes concentrações de álcool, seguidas pela realização de ensaio de viabilidade mitocondrial utilizando resazurina e análises por citometria de fluxo para quantificação de eventos de morte celular. O álcool gerou um aumento dose-dependente na morte celular, contribuindo para elucidar os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade induzida pelo álcool. Os resultados deste estudo podem fornecer subsídios para futuras pesquisas sobre os efeitos do álcool no sistema nervoso e potenciais estratégias de mitigação de seus danos.

Palavras-Chave: Neuroblasto, alcoolismo, neurotoxicidade.

ABSTRACT

Alcohol consumption is a significant risk factor for several neurodegenerative diseases, and its toxicity is a relevant topic in biological research. This study aims to evaluate the cytotoxic effects of ethanol on SH-SY5Y cell lines, a widely used model for neurobiology studies. Like many tumor-derived cell lines, SH-SY5Y is intrinsically heterogeneous, exhibiting characteristics of both progenitor cells and differentiated cells. To address this limitation, researchers frequently implement differentiation protocols that induce maturation of SH-SY5Y cells, promoting their transition to a more developed phenotype that is functionally comparable to neurons. One of the most commonly used and well-characterized methods for inducing differentiation in SH-SY5Y cells is the addition of retinoic acid (RA) to the culture medium, a derivative of vitamin A. In order to analyze the toxicity of ethanol on the human nervous system, cells were exposed to different concentrations of alcohol, followed by mitochondrial viability assays using resazurin and flow cytometry analyses to quantify cell death events. Alcohol generated a dose-dependent increase in cell death, contributing to elucidating the mechanisms underlying alcohol-induced neurotoxicity. The results of this study may provide support for future research on the effects of alcohol on the nervous system and potential strategies for mitigating its damage.

Keywords: Neuroblast, alcoholism, neurotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Células <i>SH-SY5Y</i> em frasco T-75 vistas em microscópio.....	14
Figura 02 - Células <i>SH-SY5Y</i> em alta confluência vistas em microscópio.....	15
Figura 03 - Tripsinização das células <i>SH-SY5Y</i> , inclinação do frasco T-75.....	15
Figura 04 - Alíquota pronta com meio de congelamento e células <i>SH-SY5Y</i>	16
Figura 05 - Alíquotas armazenadas em freezer -80°C.....	16
Figura 06 - Inserção da lâmina no contador de células.....	17
Figura 07 - Resultado exibido pelo contador de células do valor em ul/células.....	17
Figura 08 - Proporções e resultados para plaqueamento das células nos poços....	17
Figura 09 - Plaqueamento de 100uL da solução de células e meio de cultura	18
Figura 10 - Ácido retinoico.....	18
Figura 11 - Concentrações NOAEL e LOAEL de etanol em meio básico.....	19
Figura 12 - Placa com células <i>SH-SY5Y</i> expostas ao etanol.....	19
Figura 13 - Organização do plaqueamento celular e exposição ao etanol.....	20
Figura 14 - Pipetagem da resazurina nos poços	20
Figura 15 - Placa de 96 poços no leitor de microplacas	20
Figura 16 - Ampolas com células <i>SH-SY5Y</i> após exposição ao etanol.....	21
Figura 17 - Tampão de ligação 5X annexin-binding buffer concentrado.....	22
Figura 18 - Corante Anexina V-FITC.....	22
Figura 19 - Análise das células <i>SH-SY5Y</i> tratadas com etanol em citômetro.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Resultados obtidos após análise da absorvância por meio do espectrofotômetro.....	23
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01 - Atividade Metabólica da *SH-SY5Y* após tratamento com etanol.....23
- Gráfico 02 - Células necróticas da *SH-SY5Y* em % após exposição ao etanol...24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Etanol	13
3.2 Linhagem <i>SH-SY5Y</i>	13
4. METODOLOGIA	14
4.1 Cultura de células <i>SH-SY5Y</i>	14
4.2 Subcultivos das células <i>SH-SY5Y</i>	15
4.3 Congelamento e descongelamento das células <i>SH-SY5Y</i>	16
4.4 Plaqueamento e contagem celular	17
4.5 Diferenciação das células <i>SH-SY5Y</i>	18
4.6 Exposição das células <i>SH-SY5Y</i> ao etanol	18
4.7 Ensaio de Resazurina	19
4.8 Citometria de Fluxo	21
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXO 01 Termo de Responsabilidade e Autenticidade do Trabalho	28
ANEXO 02 Termo de Autorização para Consulta ou Publicação Eletrônica	29
ANEXO 03 Certificado de Apresentação em Evento Científico	30

1. INTRODUÇÃO

A exposição a substâncias químicas com potencial tóxico é uma preocupação constante em diversas áreas da biologia e da saúde. O etanol ou álcool etílico, substância lícita e psicoativa com propriedades que causam dependência, tem sido amplamente utilizado em muitas culturas durante os séculos. Seu uso nocivo tem um grande peso na carga de doenças, além do ônus social e econômico para as sociedades, afeta as pessoas e as sociedades de muitas formas, sendo que os seus efeitos são determinados por fatores como o volume consumido, os padrões de consumo e a qualidade do álcool (OPAS, 2020).

O consumo excessivo de álcool está associado a diversas consequências adversas à saúde e a qualidade de vida, aumentando a frequência de morbidades que causam morte ou limitações funcionais, como cirrose, alguns tipos de câncer, acidente vascular cerebral, entre outros (COSTA *et al.*, 2004). No ano de 2021, foram registrados 336.407 internações e 69.054 óbitos relacionados ao uso nocivo de álcool no Brasil de acordo com o Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA), com dados do Datasus. Ainda assim, de acordo com o “*Global Status Report on Alcohol and Health 2014*” da Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso nocivo do álcool causou aproximadamente 3,3 milhões de mortes todos os anos (ou 5,9% de todas as mortes no mundo), 4% das quais são causadas por transtornos neuropsiquiátricos.

Certas características químicas do etanol traduzem seu comportamento no organismo, como o seu baixo peso molecular e solubilidade em água, o álcool pode ser distribuído para quase todos os tecidos, inclusive sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e atingir o sistema nervoso central (SNC), o que pode causar efeito neurotóxico (ZUO *et al.*, 2017). O mecanismo de neurotoxicidade associado ao transtorno do uso de etanol foi estudado nas últimas décadas, abordando questões como alterações no metabolismo cerebral e disfunção mitocondrial (PEREIRA; ANDRADE; VALENTAO, 2015). A neurodegeneração e a depleção de neurônios no cérebro, que contribuem para algumas anormalidades comportamentais observadas no transtorno do espectro alcoólico fetal, são as consequências mais devastadoras da exposição ao etanol durante o desenvolvimento (LUO, 2014).

O álcool interfere nas vias de comunicação do cérebro e pode afetar a aparência e o funcionamento do mesmo (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2022), incluindo a disfunção mitocondrial, apoptose e danos ao DNA (CREWS; NIXON, 2009). Além disso, o consumo excessivo pode levar a déficits cognitivos e motores, como dificuldades de coordenação, visão turva, fala arrastada, tempo de resposta retardado e comprometimento da memória (CISA, 2020).

A fim de investigar os efeitos neurotóxicos do etanol, 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, 2021).

A linhagem celular *SH-SY5Y* é derivada de um neuroblastoma humano e foi originalmente isolada pela biópsia de um tumor metastático de medula óssea, sendo considerada uma sublinhagem da linhagem parental *SK-N-SH*. 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*, foram depositadas na *American Type Culture Collection* (ATCC) em 1970 por June L. Biedler (KOVALEVICH; SANTERRE, 2021).

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. Ainda assim, tanto as células *SH-SY5Y* não diferenciadas, com características morfológicas como corpos celulares semelhantes a neuroblastos, não polarizados, com expressão de marcadores neuronais imaturos e proliferação contínua com formação de aglomerados, quanto as diferenciadas, com o tratamento de agentes indutores de diferenciação, morfológicamente mais próximas a neurônios primários, são amplamente utilizadas em experimentos *in vitro* que requerem células semelhantes a neurônios (KOVALEVICH; SANTERRE, 2021).

Esta linhagem celular foi amplamente utilizada como modelo de sistema nervoso para estudar toxicidade, doenças neurodegenerativas e biologia básica neuronal (SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016), visto a capacidade de expansão em larga escala antes da diferenciação, com relativa facilidade e baixo custo para cultura em comparação aos neurônios primários (KOVALEVICH; SANTERRE, 2021). Sua utilização pode fornecer informações valiosas sobre os impactos do álcool em células neuronais, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de toxicidade e para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas.

Diante do crescente consumo de álcool e dos impactos negativos associados à sua toxicidade no sistema nervoso, torna-se essencial o desenvolvimento de estudos que investiguem suas consequências em modelos celulares apropriados. A elucidação dos mecanismos pelos quais o etanol induz danos às células neuronais pode contribuir para um melhor entendimento de suas repercussões na saúde e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e mitigação de seus efeitos adversos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a neurotoxicidade do etanol ao investigar os mecanismos envolvidos nos processos de morte neuronal, com ênfase na quantificação celular, por meio do uso de cultura de células de neuroblastoma humano *SH-SY5Y*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade mitocondrial das células *SH-SY5Y* expostas ao álcool utilizando o ensaio de resazurina com análise pelo espectrofotômetro.

- Quantificar a taxa de morte celular induzida pelo álcool por meio de citometria de fluxo.
- Comparar os efeitos tóxicos do álcool nos diferentes parâmetros avaliados, correlacionando os resultados obtidos nas duas metodologias.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Etanol

O álcool etílico (pela nomenclatura sistemática, etanol) tem a fórmula estrutural $\text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 - \text{OH}$ e pertence à grande família dos compostos orgânicos conhecidos como álcoois, ele pode ser obtido pela fermentação de açúcares e é o álcool das bebidas alcoólicas. A fermentação é usualmente realizada pela adição de levedura a uma mistura de açúcares e água. A levedura contém enzimas que promovem uma longa série de reações que resulta na conversão de um açúcar mais simples ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) no álcool etílico e no dióxido de carbono. No Brasil, a cana de açúcar é a matéria-prima de importância nas usinas de produção de açúcar e do álcool etílico (PEREIRA *et al.*, 2007).

O álcool na fase inicial do seu consumo produz como efeito um certo grau de relaxamento e desinibição do usuário, podendo ser, erroneamente, considerado como útil para o convívio social. Todavia, com o aumento de sua concentração no sangue, seus efeitos adversos diminuem a consciência, memória e sensibilidade, prejudicando a percepção do indivíduo, devido a ação dessa droga sobre o sistema nervoso central (COSTA, 2003).

Nos últimos anos, evidências científicas têm apontado a importância de conhecer o padrão de uso de álcool, que, dependendo da forma, elevaria o risco de desenvolvimento de problemas de saúde, familiares, ocupacionais, entre outros. Os problemas de saúde estão entre as principais consequências relacionadas ao uso de álcool de desenvolvimento agudo ou crônico (DE ANDRADE; DE OLIVEIRA, 2009), sendo que há ação direta sobre o sistema nervoso central, entorpecendo-o e diminuindo os reflexos (COSTA, 2003).

3.2 Linhagem *SH-SY5Y*

É uma sublinhagem da linhagem celular *SK-N-SH*, que foi estabelecida em cultura em 1970 a partir de uma biópsia de medula óssea de um neuroblastoma metastático de uma menina de 4 anos e passou por três rodadas de seleção clonal. A fonte mais relatada para acesso à linhagem celular *SH-SY5Y* é a Coleção Americana de Culturas de Tipos (ATCC, CRL-2266, depositada por JL Biedler) (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017).

Esta linhagem celular tem sido amplamente utilizada como modelo de neurônios desde o início da década de 1980, como em áreas da neurociência, incluindo pesquisas sobre doença de Alzheimer, neurotoxicidade, isquemia ou Esclerose Lateral Amiotrófica, entre outras (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017), pois essas

células possuem muitas propriedades bioquímicas e funcionais dos neurônios, como exibir atividade enzimática marcadora neuronal (tirosina e dopamina- β -hidroxilases), expressar uma ou mais proteínas de neurofilamento, além de expressarem receptores opioides, muscarínicos e de fator de crescimento nervoso (XIE; HU; LI, 2010).

Além disso, as células *SH-SY5Y* possuem a capacidade de proliferar em cultura por longos períodos sem contaminação, um pré-requisito para o desenvolvimento de um modelo celular *in vitro* (XIE; HU; LI, 2010). O fenótipo das células *SH-SY5Y* pode ser manipulado pela indução de diferentes programas de diferenciação neural terminal, entre os estudos que relatam diferenciação forçada, o método mais comum empregado é a adição de ácido retinoico (AR) (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017).

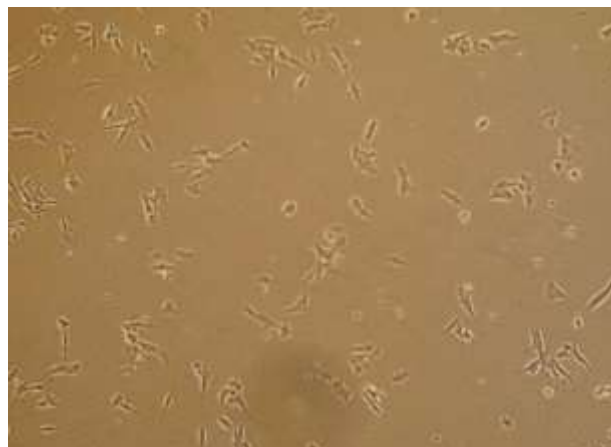
A variabilidade no crescimento celular e a sensibilidade a vários compostos, dependendo do meio e substrato usados para o crescimento de células *SH-SY5Y*, já foram relatadas (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017), logo, o desenvolvimento de um método confiável para gerar culturas neuronais humanas é fundamental para permitir que pesquisadores realizem experimentos translacionais que modelem com precisão o sistema nervoso humano (SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016).

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura de células *SH-SY5Y*

As células de neuroblastoma humano *SH-SY5Y* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal de São Paulo, cultivadas no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade do Vale do Paraíba com uso de metodologia própria da orientação deste trabalho, em meio de crescimento básico de Meio de Eagle modificado por Dulbecco / Mistura de nutrientes de Ham F-12, suplementado com 5% de soro fetal bovino com solução de antibiótico e antimicótico 1% , totalizando 4 mL por frasco de cultivo (Figura 01). As células são mantidas em um frasco de cultura à 37°C e 5% de CO₂ em estufa (Panasonic, MCO-170AICUV) e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

Figura 01 - Células *SH-SY5Y* em frasco T-75 vistas em microscópio.

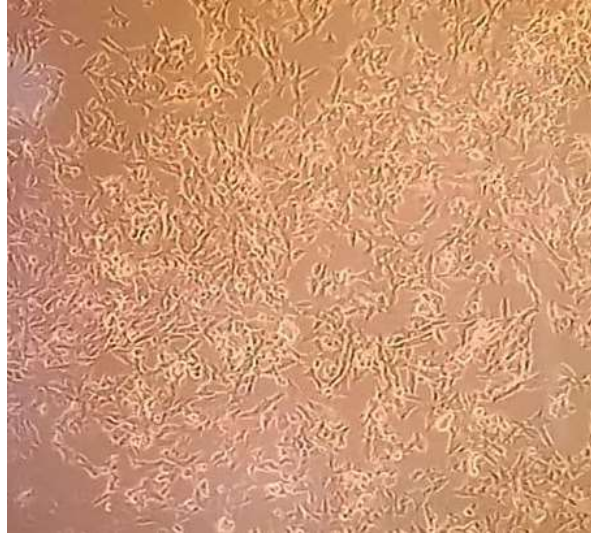


Fonte: Autora, 2025.

4.2 Subcultivos das células *SH-SY5Y*

As passagens foram realizadas ao se atingir uma confluência celular de 70-80% (Figura 02) por meio do processo de tripsinização. Para passar as células de um frasco T-75, foi aspirado o meio de cultura, adicionado 1 mL de Trypsina-EDTA 0,05% (1x) (Figura 03) e incubado na estufa (Panasonic, MCO-170AICUV) por 2-3 minutos sendo necessário inclinar suavemente para soltar as células da superfície do frasco. O conteúdo foi retirado e transferido para um tubo falcon de 15 mL, adicionado 1 mL de meio DMEM/F12 e centrifugado por 5 minutos a 1.000 xg (FANEM, Centrífuga Excelsa Baby I), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de Meio de Crescimento Básico. Após o processo, o conteúdo foi diluído no formato adequado para o experimento, distribuindo para o cultivo normal em frasco T-75, congelamento ou para o processo de diferenciação.

Figura 02 - Células *SH-SY5Y* em alta confluência vistas em microscópio.



Fonte: Autora, 2025.

Figura 03 - Tripsinização das células *SH-SY5Y*, inclinação do frasco T-75.



Fonte: Autora, 2025.

4.3 Congelamento e descongelamento das células *SH-SY5Y*

Após o processo de tripsinização, as células não diferenciadas foram congeladas em meio de congelamento contendo 50% de Meio DMEM/F12, 40% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Figura 04), o qual deve representar 30% do volume a ser colocado em uma alíquota para congelamento. Inicialmente, as alíquotas de 1 ml (Figura 05) corretamente rotuladas com a identificação das células, exibindo a passagem e data de congelamento, foram congeladas a -80°C no freezer (SANYO, Vip Series) depois, se necessário, deve-se transferir para o nitrogênio líquido para armazenamento a longo prazo.

Para o descongelamento das células tanto o meio de cultura completo, quanto as ampolas com o conteúdo congelado foram descongelados em um banho-maria a 37°C (FANEM, Modelo 12) durante aproximadamente 1 minuto. As células foram ressuspensas em 1 mL de Meio DMEM/F12 em um tubo cônico de 15 ml e depois foi centrifugado por 5 minutos a $1.000 \times g$ (FANEM, Centrífuga Excelsa Baby I). O sobrenadante foi aspirado com cuidado para não perturbar as células no pellet, o qual foi ressuspensado suavemente em 1 mL de meio DMEM/F12. As células foram plantadas em um frasco T-75 e adicionado meio suficiente para completar.

Figura 04 - Alíquota pronta com meio de congelamento e células *SH-SY5Y*.



Fonte: Autora, 2025.

Figura 05 - Alíquotas armazenadas em freezer -80°C .



Fonte: Autora, 2025.

4.4 Plaqueamento e contagem celular

Após o cultivo celular atingir a confluência desejada realizou-se o processo de tripsinização e, com o auxílio de um contador de células (Invitrogen, T10791) (Figura 06), com 25 μl da suspensão de células em cada extremidade da lâmina inserida no aparelho, obteve-se o valor em ul/células da suspensão de 5.45×10^5 células/ml (Figura 07) que foram distribuídas proporcionalmente em uma placa com 48 poços com o meio de crescimento básico (Figura 08 e Figura 09), sendo encubadas por 24 horas para fixação.

Figura 06 - Inserção da lâmina no contador de células.



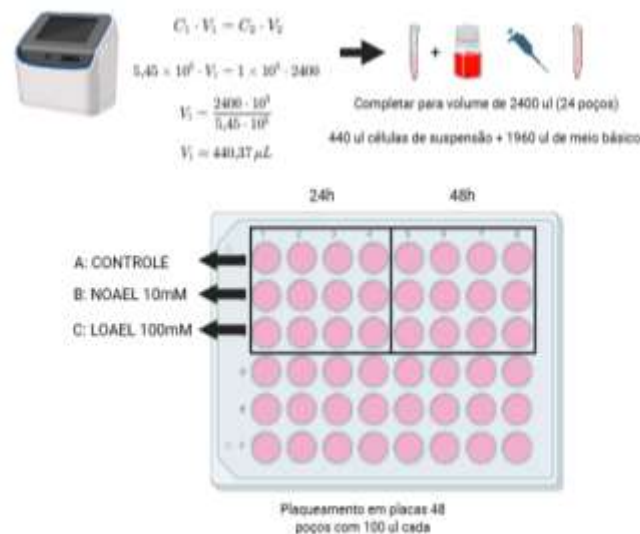
Fonte: Autora, 2025.

Figura 07 - Resultado exibido pelo contador de células do valor em ul/células.

	Conc.	% cells	# cells
Live:	5.45×10^5 cells/mL	100%	1652
Dead:	0.00×10^4 cells/mL	0%	0
Average cell size: 8 μm			
# of cells counted: 1652			
Total cell conc.: 5.45×10^5 cells/mL			

Fonte: Autora, 2025.

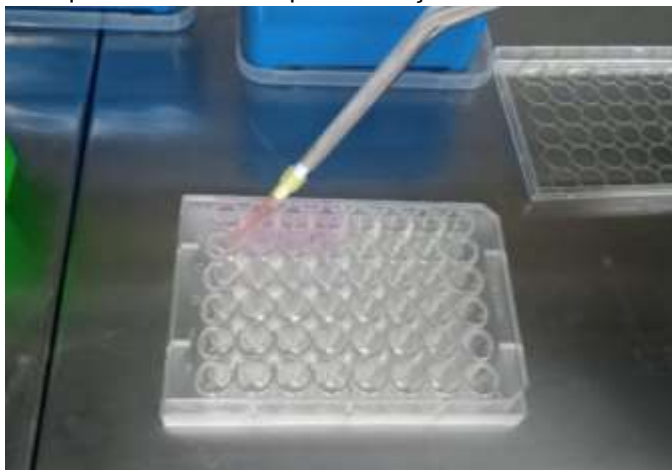
Figura 08 - Proporções e resultados para o plaqueamento das células nos poços.



Created in BioRender.com bio

Fonte: Autora, 2025.

Figura 09 - Plaqueamento de 100 μ L da solução de células e meio de cultura.



Fonte: Autora, 2025.

4.5 Diferenciação das células *SH-SY5Y*

O processo ocorre através da substituição do meio por meio neurobasal suplementado com 10 μ M de ácido retinoico (Figura 10), deve-se manter as células sob diferenciação por no máximo 5 dias. Após o período de diferenciação, o meio contendo AR é substituído por meio livre de AR, sendo ideal utilizá-las logo após a diferenciação para evitar perda de características neuronais ou morte celular.

Figura 10 - Ácido retinoico.



Fonte: Autora, 2025.

4.6 Exposição das células *SH-SY5Y* ao etanol

Para esta etapa do experimento foram utilizadas as células ainda não diferenciadas para uma verificação inicial, sendo o teste com as concentrações de etanol sobre as células diferenciadas uma etapa a ser realizada futuramente para comparação.

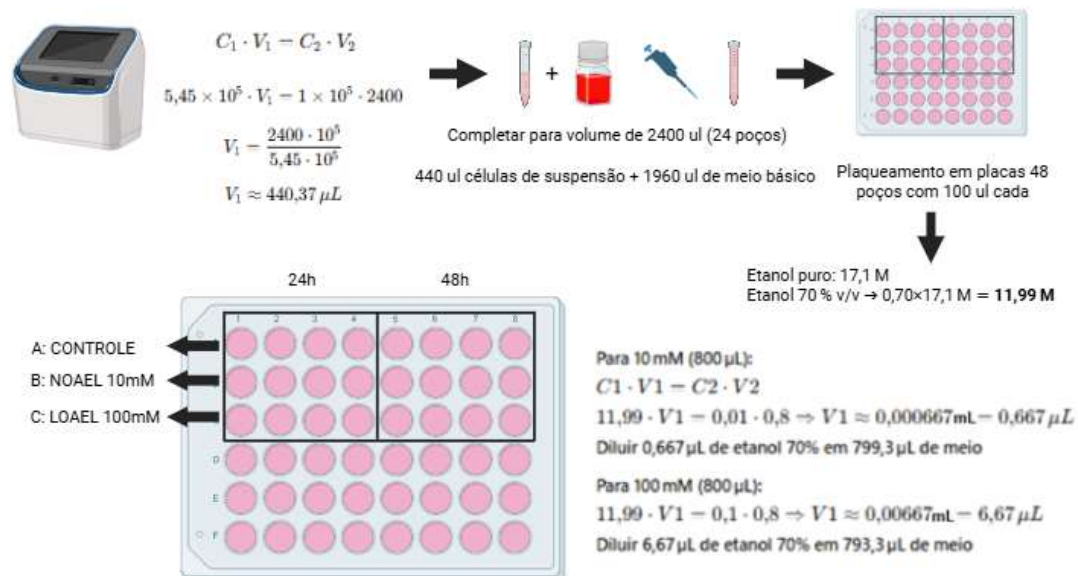
O meio de cultura inicial foi retirado e adicionado o meio contendo as concentrações NOAEL (N) Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis e LOAEL (L) Nível Mínimo Com Efeitos Adversos Observáveis de etanol (Figura 11), respectivamente, 10mM e 100mM (PEREIRA, 2020). Ambas as doses de etanol (10mM e 100mM) passaram por períodos de 24 horas e 48 horas de exposição (Figura 12).

Figura 11 - Concentrações NOAEL e LOAEL de etanol em meio básico.



Fonte: Autora, 2025.

Figura 12 - Placa com células *SH-SY5Y* expostas ao etanol.



Created in BioRender.com bio

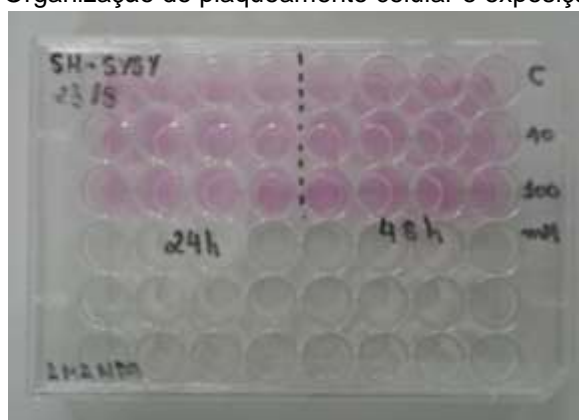
Fonte: Autora, 2025.

4.7 Ensaio de Resazurina

As células que foram semeadas em placas de cultura e expostas as concentrações de etanol NOAEL (N) e LOAEL (L) pelos períodos de 24 e 48 horas (N24h, L24h, N48h e L48h) e as controle (Figura 13) tiveram o meio substituído por solução de resazurina a 10% diluída em meio de diferenciação neuronal (Figura 14). As células são incubadas a 37 °C e 5% de Dióxido de Carbono, por 1 h em estufa (Panasonic, MCO-170AICUV). Posteriormente, a solução de cada poço é transferida para uma nova placa de 96 poços (Figura 15) para medição de fluorescência usando um leitor de

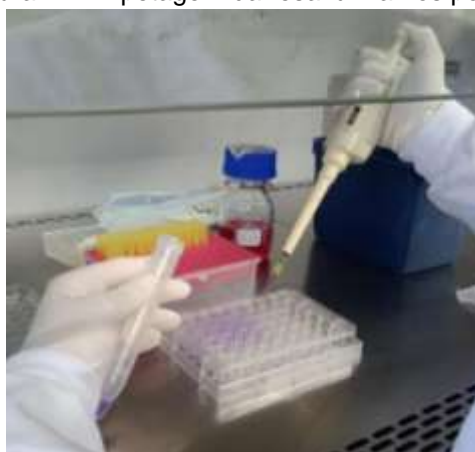
microplacas (leitura de fundo; excitação: 544 nm; emissão: 570 nm) (Packard, SpectraCount). Os resultados são apresentados como uma porcentagem do controle.

Figura 13 - Organização do plaqueamento celular e exposição ao etanol.



Fonte: Autora, 2025.

Figura 14 - Pipetagem da resazurina nos poços.



Fonte: Autora, 2025.

Figura 15 - Placa de 96 poços no leitor de microplacas.



Fonte: Autora, 2025.

4.8 Citometria de Fluxo

Foram plaqueadas 1×10^5 células *SH-SY5Y* por poço em placas de 24 poços com 1 mL de meio DMEM/F12. As células foram incubadas por 24 horas à 37°C com 5% CO₂ para aderência. Preparou-se as concentrações de etanol desejadas (10mM e 100mM) diluindo em meio de cultura. O meio das células foi substituído pelo meio contendo etanol, seguida da incubação por 24 e 48 horas. Após o tratamento, para controle de morte uma fileira da placa de 24 poços foi exposta a alta dose de DMSO. Todas as células foram coletadas utilizando o processo de tripsinização, além das células suspensas, em ampolas de 5 ml (CM como controle morte; CV para células vivas; 10mM de etanol 24hr; 10mM de etanol 48hr; 100mM de etanol 24hr; 100mM de etanol 48hr), totalizando 6 ampolas (Figura 16), as quais foram lavadas com PBS 1X e solução tampão, preparada com tampão de ligação 5X *annexin-binding buffer* (Figura 17) com 9 partes de água destilada, para a etapa seguinte de centrifugação a 400 g por 5 min a 4°C. O pellet foi ressuscitado em PBS 1X e prosseguiu-se para a coloração.

Para a coloração com Anexina V-FITC (Figura 18), preparou-se a solução de 570ul de tampão de ligação com 30ul de anexina, distribuindo 100ul para cada uma das ampolas, as quais foram incubadas por 15 min no escuro e temperatura ambiente. Foi adicionado em cada ampola 2 mL de tampão de ligação, com nova centrifugação e ressuspensão do pellet em 200 ul da própria solução tampão. Foi preparada uma solução de 1.200ul de solução tampão com 30ul de iodeto, distribuída igualmente entre as ampolas, com incubação de 5-15 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram processadas dentro de 30 min para evitar degradação da fluorescência. A leitura foi realizada no Citômetro de Fluxo BD Accuri-Central (Flow Cytometer, BD Accuri C6) (Figura 19) do Laboratório Multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IPD-UNIVAP) para obter porcentagem de células vivas, apoptóticas e necróticas.

Figura 16: Ampolas com células *SH-SY5Y* após exposição ao etanol.



Fonte: Autora, 2025.

Figura 17: Tampão de ligação 5X annexin-binding buffer concentrado.



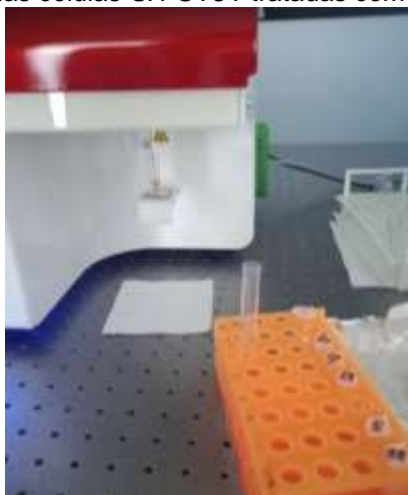
Fonte: Autora, 2025.

Figura 18: Corante Anexina V-FITC.



Fonte: Autora, 2025.

Figura 19: Análise das células SH-SY5Y tratadas com etanol em citômetro.



Fonte: Autora, 2025.

5. RESULTADOS

A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada por meio do ensaio de resazurina, corante azul que mediu a atividade metabólica das células SH-SY5Y devido à conversão do reagente em resorufina, corante rosa, nas mitocôndrias

celulares ativas, após exposição ao etanol nas concentrações de 10 mM e 100 mM, por 24 h e 48 h. Os controles apresentaram valores de absorvância consistentes com a viabilidade basal, servindo como referência para a comparação com os grupos tratados, sendo possível obter os valores médios de absorvância (Tabela 01).

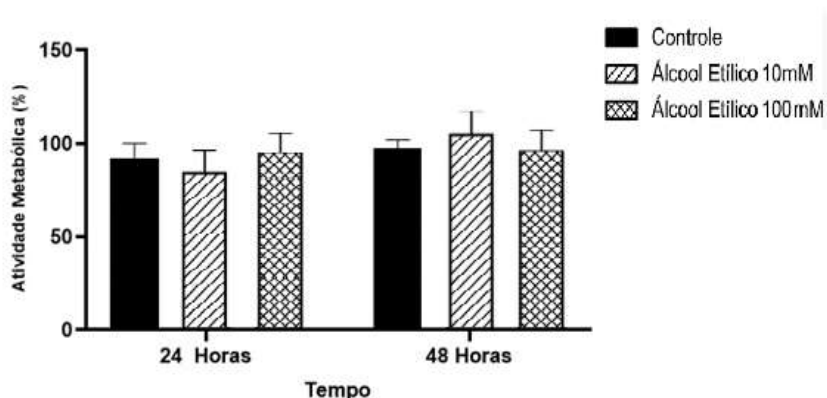
Tabela 01 – Resultados obtidos após análise de absorvância por meio do espectrofotômetro.

Grupo	Absorvância média
Controle 24h	0.509
Álcool 10 mM 24h	0.494
Álcool 100 mM 24h	0.782
Controle 48h	0.671
Álcool 10 mM 48h	0.737
Álcool 100 mM 48h	0.777

Fonte: Autora, 2025.

Com base nesses dados, a concentração de 10 mM de etanol não causou redução significativa da atividade metabólica, sendo considerada como o NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), definido como a maior concentração testada que não induz efeitos tóxicos observáveis em comparação ao controle, para este modelo. Já a concentração de 100 mM apresentou aumento inesperado em ambos os valores de absorvância, mas com alta variação entre réplicas (Gráfico 01). Não foi possível identificar um efeito tóxico claro com base apenas neste primeiro ensaio do trabalho, portanto, a classificação de LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*), neste momento, depende da resolução apresentada pelo outro teste seguinte.

Gráfico 01 – Atividade Metabólica da SH-SY5Y após tratamento com etanol.

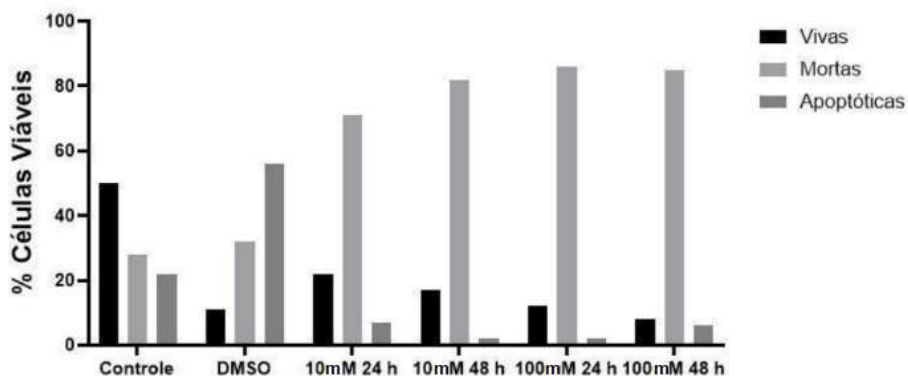


Fonte: Autora, 2025.

Ainda assim, a citometria de fluxo demonstrou prevalência de células necróticas (mortas), cálculo estatístico conduzido pelo software *GraphPad Prisma ANOVA one-way*, seguido do teste Bonferroni valor de $p < 0,05$ (Gráfico 02), fato que ratifica a

classificação NOAEL e LOAEL de etanol utilizados e corrobora a hipótese de que o etanol induz efeitos celulares.

Gráfico 02: Células necróticas da *SH-SY5Y* em % após exposição ao etanol.



Fonte: Autora, 2025.

6. DISCUSSÃO

O consumo de álcool é uma realidade global estando associado a diversas doenças neurodegenerativas e disfunções cognitivas. Seus efeitos adversos sobre o organismo, especialmente no sistema nervoso central (SNC), têm sido amplamente documentados, mas ainda há lacunas no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neurotoxicidade do etanol. A compreensão detalhada dos efeitos do álcool ainda requer mais investigações, especialmente utilizando modelos celulares que permitam a avaliação da toxicidade em condições e quantificações controladas.

A diferenciação de células de neuroblastoma *SH-SY5Y* em células com um fenótipo neuronal mais especializado, utilizando estratégias de manipulação do meio de cultura, têm sido fundamentais para avanços significativos no campo da neurociência. Essa abordagem possibilitou a obtenção de modelos celulares mais representativos, ampliando a compreensão dos mecanismos moleculares e funcionais envolvidos em processos neurológicos e em patologias associadas.

No presente estudo, o ensaio de resazurina foi utilizado para avaliar a atividade metabólica das células *SH-SY5Y* expostas ao etanol. Os resultados sugerem um efeito citotóxico progressivo, com redução da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição. Esse achado é consistente com estudos prévios que relacionam a neurotoxicidade induzida pelo etanol à mecanismos como alterações no metabolismo cerebral e disfunção mitocondrial (PEREIRA; ANDRADE; VALENTÃO, 2015).

Além disso, a disfunção mitocondrial observada pode refletir não apenas a perda de viabilidade celular, mas também uma redução na capacidade funcional das células sobreviventes.

Os resultados obtidos por meio da citometria de fluxo reforçam as observações do ensaio de viabilidade mitocondrial, evidenciando um aumento significativo na

proporção de células necróticas em resposta à exposição ao etanol. A análise estatística confirmou a relevância dessas diferenças entre os grupos experimentais.

Dessa forma, a aplicação de mais de uma metodologia laboratorial sobre o experimento permite uma análise detalhada dos efeitos do etanol, fornecendo dados quantitativos e qualitativos sobre morte celular de forma comparativa. Esse achado corrobora a classificação dos valores de NOAEL e LOAEL estabelecidos para as concentrações de etanol testadas, sugerindo que, a partir de determinado limiar, o etanol é capaz de induzir morte celular significativa.

Esses resultados reforçam a hipótese de que o consumo contínuo de álcool etílico, mesmo em concentrações moderadas, altera a homeostase celular, promovendo danos estruturais e funcionais que culminam em morte celular. A associação entre os dados de viabilidade nas mitocôndrias (resazurina) e citometria de fluxo demonstra de forma complementar a intensidade dos efeitos citotóxicos do etanol sobre as células *SH-SY5Y*, validando a utilização conjunta dessas metodologias para a caracterização do perfil de toxicidade.

Este estudo se torna relevante ao buscar ampliar o conhecimento sobre os efeitos do etanol em células neuronais, visto que é fundamental elucidar os mecanismos da neuroapoptose induzida pelo etanol para desenvolver abordagens terapêuticas eficazes para melhorar a neurotoxicidade do etanol (LUO, 2014), fornecendo evidências que podem contribuir para a compreensão da neurotoxicidade do álcool e seus impactos sobre diferentes condições e períodos.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos citotóxicos do etanol sobre células de neuroblastoma humano *SH-SY5Y*, modelo amplamente utilizado em estudos de neurotoxicidade.

Através do ensaio de resazurina, para evidenciar o comprometimento da atividade mitocondrial induzido pelo etanol, verificou-se que a exposição a 10 mM de etanol não provocou alterações significativas na atividade metabólica das células, caracterizando-se como NOAEL, ou seja, a concentração mais elevada que não gerou efeitos tóxicos observáveis em comparação ao controle. Em contraste, a concentração de 100 mM apresentou valores de absorvância inesperadamente maiores, acompanhados de considerável variação entre as réplicas, o que inviabilizou a definição imediata de um LOAEL com base apenas nesse ensaio, tornando necessária a utilização de análises complementares.

A citometria de fluxo, utilizada em seguida, possibilitou uma análise mais detalhada dos efeitos do etanol sobre a integridade celular, evidenciando um aumento expressivo na proporção de células necróticas em concentrações mais elevadas, o que confirmou a ação citotóxica do etanol e permitiu consolidar a classificação de NOAEL e LOAEL para este modelo experimental.

Em conjunto, esses achados fornecem evidências consistentes dos efeitos nocivos do etanol em células neuronais, corroborando sua ação neurotóxica em nível celular.

Esses achados reforçam a importância de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na exposição ao etanol, contribuindo para o avanço de estratégias preventivas e terapêuticas voltadas à redução dos impactos do consumo de álcool no sistema nervoso central e futuras pesquisas na área da neurociência e toxicologia.

REFERÊNCIAS

CENTRO DE INFORMAÇÃO SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (CISA). **Artigos científicos**. Disponível em: <<https://cisa.org.br/pesquisa/artigos-cientificos>>. Acesso em: 21 mar. 2025.

COSTA, J. S., SILVEIRA, M. F., GAZALLE, F. K., OLIVEIRA, S. S., HALLAL, P. C., MENEZES, A. M., GIGANTE, D. P., OLINTO, M. T., MACEDO, S. **Heavy alcohol consumption and associated factors: a population-based study**. Rev Saude Publica, v. 38, n. 2, p. 284-91, Apr 2004. ISSN 0034-8910 (Print) 0034-8910.

COSTA, Rita Mara Reis. **O álcool e seus efeitos no sistema nervoso**. 2003. Disponível em: <<https://repositorio.uniceub.br/jspui/handle/123456789/2371>>.

CREWS, F. T.; NIXON, K. **Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism**. *Alcohol and Alcoholism*, v. 44, n. 2, p. 115–127, 2009.

DE ANDRADE, Arthur Guerra; DE OLIVEIRA, Lúcio Garcia. **Principais consequências em longo prazo relacionadas ao consumo moderado de álcool**. 2009. Disponível em: <<https://www.saudedireta.com.br/docsupload/1333061365alcoolesuasconsequencias-pt-cap2.pdf>>.

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

GRIGOLI, Marina Mantellatto. **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**. 2023. Dissertação (Mestrado em Gerontologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/20.500.14289/18749>>.

KOVALEVICH, J.; Langfors, D. **Considerations of the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology**. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 1078, p. 9-21, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23975817/>>

LUO, J. **Autophagy and ethanol neurotoxicity**. *Autophagy*, v. 10, n. 12, p. 2099-108, 2014. ISSN 1554-8635 (Electronic). 1554-8627 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25484085>>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Álcool**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/alcool>>. Acesso em: 21 mar. 2025.

PEREIRA, Débora Sanchez *et al.* **Obtenção do Álcool Etilico**. Revista Souza Marques, v. 8, n. 19, p. 74-76, 2007. Disponível em: <https://revista.souzamarques.br/index.php/REVISTA_SOUZA_MARQUES/article/view/311>.

PEREIRA, Gabriela Otofujii. **Avaliação do estresse oxidativo na neurotoxicidade induzida por cetamina, etanol e a associação de ambas as substâncias em células sh-sy5y**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. Disponível em: <<https://bdta.abcd.usp.br/directbitstream/28e4d0d9-876d-426c-98da-fc2d55795b1e/3061605.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2025.

PEREIRA, R. B.; ANDRADE, P. B.; VALENTAO, P. **A Comprehensive View of the Neurotoxicity Mechanisms of Cocaine and Ethanol**. Neurotox Res, v. 28, n. 3, p. 253-67, Oct 2015. ISSN 1476-3524 (Electronic). 1029-8428 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26105693>>.

SHIPLEY, Mackenzie M *et al.* **“Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line.”** Journal of visualized experiments : JoVE ,108 53193. 17 Feb. 2016, doi:10.3791/53193 - Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26967710/>>.

SILVA, J. da. (2007). **O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica**. Genética Na Escola, 2(2), 30–33. <https://doi.org/10.55838/1980-3540.ge.2007.45>

XICOY, H., Wieringa, B. & Martens, GJ. **A linhagem celular SH-SY5Y na pesquisa da doença de Parkinson: uma revisão sistemática**. *Mol Neurodegeneration* 12, 10 (2017). Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>>.

XIE, Hong-rong; HU, Lin-sen; LI, Guo-yi. **SH-SY5Y human neuroblastoma cell line:in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease**. Chinese Medical Journal 123(8):p 1086-1092, April 2010. Disponível em: < https://journals.lww.com/cmj/fulltext/2010/04020/SH_SY5Y_human_neuroblastoma_cell_line_in_vitrocell.23.aspx>.

ZUO, D., LIU, Y., LIU, Z., CUI, J., ZHOU, X., LIU, Y., LI, Z., WU, Y. **Alcohol aggravates ketamine-induced behavioral, morphological and neurochemical alterations in adolescent rats: The involvement of CREB-related pathways**. Behav Brain Res, v.349, p. 80-90, Sep 3 2018. ISSN 1872-7549 (Electronic). 0166-4328 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29738804>>.