

EFEITOS DO ÁLCOOL EM CÉLULAS NERVOSAS HUMANAS: AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO ETANOL EM SH-SY5Y

Amanda Caroline da Silva Santos¹, Cristina Pacheco Soares².

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, amandacs.santos77@gmail.com, cpsoares@univap.br

Resumo

O consumo de álcool é um fator de risco para diversas doenças neurodegenerativas, sendo sua toxicidade tema relevante na pesquisa biológica. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos do álcool etílico em células da linhagem SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de álcool, seguidas pela realização de ensaio de viabilidade celular utilizando resazurina e citometria de fluxo para quantificação da morte celular. A concentração de 10 mM de etanol foi estabelecida como NOAEL, pois não resultou em redução significativa da atividade metabólica, enquanto que em 100 mM, observou-se aumento na absorbância, porém com alta variabilidade entre réplicas, no teste de resazurina, já a citometria demonstrou predominância de células mortas em ambas as concentrações de etanol, sendo necessário e previsto a realização de testes adicionais, como ensaio cometa, para ratificação mais precisa da toxicidade do etanol. 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. Morte celular. Neurotoxicidade.

Área do Conhecimento: Biologia Geral.

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 importância significativa na carga de doenças devido ao seu uso nocivo, sendo que os seus efeitos são determinados por fatores como o volume consumido, os padrões de consumo e a qualidade do álcool (OPAS, 2020). No ano de 2021, foram registrados 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. 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, 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, sendo capaz de atingir o sistema nervoso central (SNC), o que pode causar efeito neurotóxico (ZUO et al., 2017). O álcool interfere nas vias de comunicação do cérebro e pode afetar o funcionamento do mesmo (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2022), incluindo a disfunção mitocondrial, apoptose e danos ao DNA (CREWS; NIXON, 2019).

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 uma sublinhagem da linhagem celular SK-N-SH, estabelecida em cultura em 1970 a partir de biópsia de neuroblastoma metastático e passou por três rodadas de seleção clonal (XICOY; Wieringa; Martens, 2017).

Em cultura, se apresentam como células tanto aderentes quanto flutuantes, sendo ambas viáveis para cultivo e realização de ensaios. Ainda assim, tanto as células SH-SY5Y não diferenciadas, com características morfológicas como corpos celulares semelhantes a neuroblastos, com expressão de marcadores neuronais imaturos e proliferação contínua de aglomerados, quanto as diferenciadas,

morfologicamente 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).

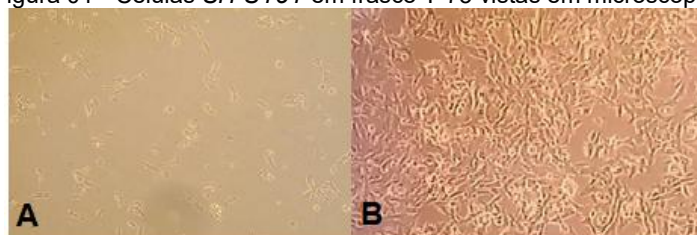
Diante do crescente consumo de álcool e dos impactos negativos associados à sua toxicidade no sistema nervoso, torna-se essencial o desenvolvimento de estudos que investiguem suas consequências em modelos celulares apropriados. A elucidação dos mecanismos pelos quais o etanol induz danos às células neuronais 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.

Metodologia

Células *SH-SY5Y* foram gentilmente cedidos 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 metodologia do próprio laboratório, em meio de crescimento básico DMEM/F12 suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% de AA antibiótico e antimicótico, totalizando 4 mL por frasco de cultivo. As células são mantidas em um frasco T-75 a 37°C e 5% de CO₂ em estufa (Panasonic, MCO-170AICUV) e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

As passagens foram realizadas ao se atingir uma confluência celular de 70-80% (Figura 01) por meio do processo de tripsinização. Para propagação das células, foi aspirado o meio de cultura, adicionado 1 mL de Trypsina-EDTA 0,05% (1x) e incubado na estufa (Panasonic, MCO-170AICUV) por 2-3 minutos. A suspensão de células foi retirada e transferida para um tubo falcon de 15 mL, adicionado 1 mL de Meio de Crescimento Básico e centrifugado por 5 minutos a 1.000 x g (FANEM, Centrífuga Excelsa Baby I), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em meio DMEM/F12. As células obtidas foram distribuídas em garrafas ou placas para o cultivo normal, para o processo de diferenciação ou em ampolas para congelamento.

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



A: Células *SH-SY5Y* em início de cultura.
B: Células *SH-SY5Y* em alta confluência.

Fonte: Autora, 2025.

Após atingir a confluência desejada, as células foram submetidas à tripsinização. A quantificação celular foi realizada utilizando um contador automático de células (Invitrogen, T10791), com 25 µL da suspensão celular posicionados em cada extremidade da lâmina do dispositivo, permitindo a determinação da concentração celular (µL/célula) (Figura 02). Em seguida, as células foram distribuídas proporcionalmente em uma placa de 48 poços, contendo meio de crescimento básico, e incubadas por 24 horas para fixação.

Figura 02 - Resultado exibido pelo contador de células do valor em ul/células.

	Conc.	% cells	# cells
Live:	5.45X10e5 cells/mL	100%	1652
Dead:	0.00X10e4 cells/mL	0%	0

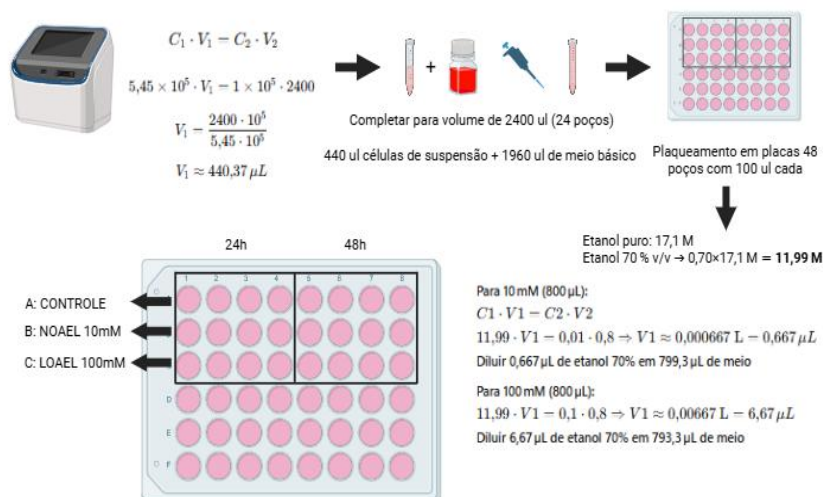
Fonte: Autora, 2025.

Para a etapa de exposição das células ao etanol 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

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

retirado e adicionado o meio contendo as concentrações NOAEL “N” e LOAEL “L” de etanol, respectivamente, 10mM e 100mM (PEREIRA, 2020). Ambas as doses de etanol passaram por períodos de 24 horas e 48 horas de exposição (Figura 03).

Figura 03 - Placa com células *SH-SY5Y* expostas ao etanol.



Fonte: Autora, 2025.

Para o ensaio da Resazurina, as células que foram semeadas em placas de cultura e expostas às concentrações de etanol (N24h, L24h, N48h e L48h) e as controle devem ter o meio substituído por solução de resazurina a 10% diluída em meio de diferenciação neuronal. 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 para medição de fluorescência usando um leitor de microplacas (Figura 04) (leitura de fundo; excitação: 544 nm; emissão: 570 nm) (Packard, SpectraCount). Os resultados são apresentados como uma porcentagem do controle.

Figura 04 –Ensaio da Resazurina.



Fonte: Autora, 2025.

Para a análise na citometria de fluxo foi repetida a fase de plaqueamento celular, seguida de diferenciação utilizando meio básico suplementado com 10 μL de ácido retinoico durante cinco dias e exposição às concentrações NOAEL e LOAEL de etanol durante 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 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, as quais foram lavadas com PBS 1X e solução tampão, preparada com tampão de ligação 5X *annexin-binding buffer* 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. Para a coloração com Anexina V-FITC, preparou-se a solução de 570 μL de tampão de ligação com 30 μL de anexina, distribuindo 100 μL para as ampolas, as quais foram incubadas por 15 min no escuro. Foi preparada uma solução de 1.200 μL de solução tampão com 30 μL de iodeto, distribuída igualmente entre

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

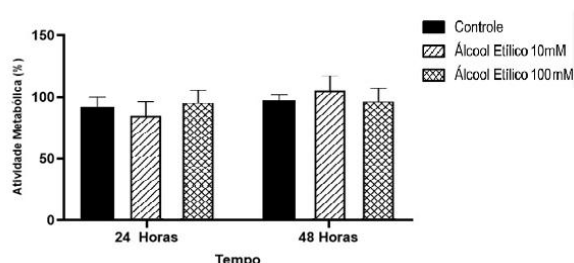
as ampolas, com incubação de 5 minutos. As amostras foram processadas dentro de 30 min para evitar degradação da fluorescência. A leitura foi realizada no Citômetro de Fluxo BD Accuri-Central (Flow Cytometer, BD Accuri C6). para obter porcentagem de células vivas, apoptóticas e necróticas.

Resultados

A avaliação da atividade mitocondrial e citoplasmática foi realizada por meio do ensaio de resazurina, corante azul não fluorescente que mediu a atividade metabólica das células SH-SY5Y devido à conversão do reagente em resorufina, corante rosa fluorescente, 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, sendo possível obter os valores médios de absorvância.

Com base nos dados obtidos, 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 nos valores de absorvância, mas com alta variação entre réplicas (Figura 05). Não foi possível identificar um efeito tóxico claro com base apenas neste ensaio, portanto, a classificação de LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) ainda depende da confirmação por outros testes.

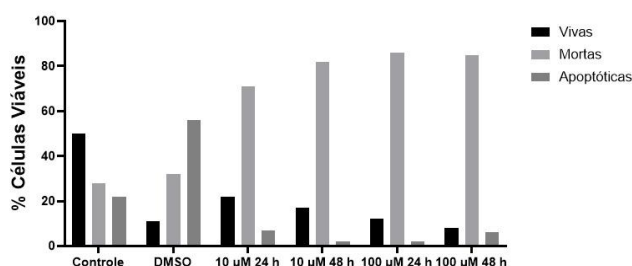
Figura 05 – Atividade Metabólica da SH-SY5Y após tratamento com etanol.



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 $p < 0,05$ (Figura 06), fato que ratifica a classificação NOAEL e LOAEL de etanol utilizados e corrobora a hipótese de que o etanol induz efeitos celulares.

Figura 06 – Células necróticas da SH-SY5Y em % após exposição ao etanol.



Fonte: Autora, 2025.

Discussão

Nos últimos anos, evidências científicas têm reforçado a importância de compreender o padrão de uso do álcool, considerando que os problemas de saúde estão entre as principais consequências relacionadas ao seu consumo (DE ANDRADE; DE OLIVEIRA, 2009). O etanol exerce ação direta sobre o sistema nervoso central, causando efeitos como entorpecimento e redução dos reflexos (COSTA, 2003). Para investigar a toxicidade dessa substância em células neuronais humanas, diversos estudos

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

utilizam a linhagem *SH-SY5Y*, amplamente empregada como modelo experimental em pesquisas neurobiológicas, sendo que a variabilidade no crescimento e a sensibilidade a compostos podem variar conforme o meio e o substrato de cultivo, o que já foi relatado na literatura (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017).

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).

A disfunção mitocondrial observada pode refletir não apenas a perda de viabilidade celular, mas também uma redução na capacidade funcional das células sobreviventes. Esse comprometimento funcional reforça a necessidade de análises complementares para elucidar os mecanismos de toxicidade do etanol, incluindo a avaliação do tipo de morte celular e a verificação de danos ao DNA, etapas fundamentais para a compreensão integral dos efeitos neurotóxicos dessa substância.

Conclusão

O presente trabalho avaliou os efeitos citotóxicos e genotóxicos do etanol sobre células de neuroblastoma humano *SH-SY5Y*, empregando, inicialmente, o ensaio de resazurina para mensurar da resposta mitocondrial das células.

Como continuidade do estudo, está prevista análise complementar utilizando teste cometa, que permitirá a avaliação do dano ao DNA. Essa etapa é essencial para a compreensão aprofundada dos mecanismos de toxicidade do etanol em células neuronais, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre seus efeitos neurotóxicos.

Dessa forma, espera-se que os resultados obtidos forneçam evidências concretas sobre os efeitos negativos do etanol em células neuronais, contribuindo para uma melhor compreensão de seus mecanismos de toxicidade.

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, 2019.

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>>.

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>>.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

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 Otofui. **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, M. M. ; Mangold, C.A. ; Szpara, M. L. **Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line** - 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>>.