

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**DIFERENCIAÇÃO COLINÉRGICA DA LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA
HUMANO SH-SY5Y E SEU USO COMO MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

LIANA MARENGO DE MEDEIROS

PORTO ALEGRE, ABRIL DE 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**DIFERENCIAÇÃO COLINÉRGICA DA LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA
HUMANO SH-SY5Y E SEU USO COMO MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

ALUNA: LIANA MARENGO DE MEDEIROS

ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO KLAMT

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas: Bioquímica.

PORTO ALEGRE, ABRIL DE 2015.

Este trabalho foi realizado Laboratório de Bioquímica Celular - LBC (laboratório 24), Departamento de Bioquímica Prof. Tuiskon Dick do Instituto de Ciência Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através da Chamada CNPq/MS/SCTIE/DECIT No 27/2014 - Pesquisas sobre Doenças Neurodegenerativas (466989/2014-8), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS).

It is not enough to have a good mind;

the main thing is to use it well

Rene Descartes

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos aqueles que, de uma forma ou de outra, me deram suporte para chegar ao final desta etapa.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Bioquímica Celular, pelo companherismo, por todos os momentos que me proporcionaram. Agradeço de coração principalmente à Patrícia Schonhofen, ao Marco Antônio e à Ivi Bristot, toda a ajuda fundamental que recebi desde o início desse projeto. Agradeço ao Professor Fábio Klamt, por todo o entusiasmo, por ter aberto as portas de seu Laboratório para mim, por ser sempre muito acessível e por ter me ensinado, mesmo que indiretamente, a me tornar mais independente.

Aos meus grandes amigos, da graduação, da infância, agradeço por me proporcionarem alguns dos melhores momentos da minha vida e por terem acompanhado e torcido ao longo de toda a minha trajetória até hoje.

Ao Charles, por também ter sido de grande ajuda e apoio sempre que precisei, por apontar meus erros, por me fazer crescer como pessoa, por ser meu namorado, amigo, parceria.

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

SUMÁRIO

PARTE I	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS	10
INTRODUÇÃO	12
DOENÇA DE ALZHEIMER	12
DOENÇA DE ALZHEIMER E O SISTEMA COLINÉRGICO.....	13
BIOMARCADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER	15
TAU.....	15
β-AMILÓIDE	17
HIPÓTESES PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER	19
MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	22
A LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y	24
OBJETIVOS	26
Objetivo Geral	26
Objetivos Específicos:.....	26
PARTE II	27
CAPITULO I.....	28
MATERIAS E MÉTODOS	29
Cultivo Celular e Diferenciação Colinérgica	29
Meta-Análise de bancos de expressão gênica	32
Parâmetros Bioquímicos	32
Ensaio de Citotoxicidade.....	35
Quantificação de Proteína.....	35
Análise Estatística	36
CAPITULO II	37

RESULTADOS.....	38
Análise Morfológica.....	38
Análise Bioquímica.....	42
Neurotoxicidade.....	43
PARTE III.....	50
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

PARTE I

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada por um declínio cognitivo global, incluindo uma perda progressiva de memória, orientação e raciocínio, associada com a degeneração específica de neurônios colinérgicos. As alterações histopatológicas que definem a DA são depósitos proteicos de β -amilóide e tau hiperfosforilada em placas senis e emaranhados neurofibrilares, respectivamente. Porém, os mecanismos moleculares que levam a DA não estão bem caracterizados e ainda não há nenhum tratamento eficaz para prevenir ou reverter os seus sintomas. Parte dessa dificuldade se deve à escassez de modelos experimentais adequados. Previamente nosso grupo estabeleceu condições experimentais para a diferenciação do neuroblastoma humano SH-SY5Y em neurônios dopaminérgicos a partir da adição de ácido retinóico (AR). Alguns estudos sugerem que esta linhagem, quando tratada com AR e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), apresenta uma mudança para um fenótipo colinérgico. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo caracterizar a diferenciação colinérgica desta linhagem e estabelecer as melhores condições de tratamento com ácido oadáico (AO), que promove a hiperfosforilação e deposição da proteína tau, em combinação com oligômeros solúveis de β -amilóide ($A\beta_{1-42}$), para uso como modelo *in vitro* ao estudo da DA. As células proliferativas foram cultivadas em meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB). A diferenciação foi induzida com 10 μ M de AR em meio de cultura com 1% de SFB durante sete dias, sendo o BDNF (10 nM) acrescentado a partir do quarto dia. Determinamos a atividade da Acetilcolinesterase (AChE), da Colina Acetiltransferase (ChAT) e o imunoconteúdo de ChAT como marcadores colinérgicos. O co-tratamento com BDNF resultou em células com notável morfologia neuronal, apresentando aumento na densidade e comprimento de neuritos e nos marcadores colinérgicos. Após o estabelecimento do modelo colinérgico, as células diferenciadas da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y foram desafiadas com uma curva de dose das neurotoxinas $A\beta_{1-42}$ ou AO, e a neurotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) em combinação com a densidade de neuritos. A partir desses resultados, doses subletais das toxinas foram selecionadas para estabelecer o modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer. Esses resultados fazem dessa linhagem celular uma ferramenta útil no campo da neurociência, podendo torná-la um modelo adequado para o estudo da Doença de Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a global cognitive decline, including progressive loss of memory, orientation and reasoning associated with a specific degeneration of cholinergic neurons. Histopathological changes that define AD are amyloid- β and hyperphosphorylated tau deposits in senile plaques and neurofibrillary tangles, respectively. However, the leading molecular mechanisms are not well elucidated and still there is no effective treatment to prevent or reverse the symptoms. Part of this difficulty is due to the lack of suitable experimental models. Our group previously established experimental conditions for the differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into dopaminergic neurons-like with retinoic acid (RA) addition. Some studies suggested that when treated with RA and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) this cell line has a shift to a cholinergic like phenotype. Thus, this study aims to characterize the cholinergic differentiation of SH-SY5Y cell line and to determine the best conditions for okadaic acid (OA) treatment, which promotes the deposition and hyperphosphorylation of tau protein, in combination with soluble oligomers of β -amyloid (A β 1-42). Thereby we established a suitable AD in vitro model. Exponentially growing SH-SY5Y cells were maintained in DMEM / F12 medium with 10% fetal bovine serum (FBS). Differentiation was triggered by the combination of 10 μ M of RA plus medium with 1% of FBS during 7 days, BDNF was added on 4th day. We determined Acetylcholinesterase (AChE) and Choline Acetyltransferase (ChAT) enzymatic activities and the ChAT immunocontent as cholinergic markers. Co-treatment with BDNF resulted in remarkable cells with neuronal morphology, an increase in neurites density and length and cholinergic markers. Once the cholinergic like in vitro model was established, the differentiated SH-SY5Y cells were challenged with a A β 1-42 or AO dose curve, and neurotoxicity was evaluated by an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in combination with neurite density. Hence, sublethal doses of neurotoxins were selected to determine the in vitro model of Alzheimer's disease. Taken together, these results suggested SH-SY5Y cell line as a useful and suitable model in Alzheimer's disease research.

LISTA DE ABREVIATURAS

β a: β -amilóide

ACh: Acetilcolina

ChAT: Colina Acetiltransferase

AChE: Acetilcolinesterase

AR: Ácido Retinóico

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

DA: Doença de Alzheimer

GEO: Gene Expression Omnibus

NFT: Emaranhados Neurofibrilares (*Neurofibrillary Tangles*)

PCB: Prosencéfalo Basal

VACHT: Transportador Vesicular de Acetilcolina

INTRODUÇÃO

DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem caracterizada clinicamente por um declínio cognitivo global, incluindo uma perda progressiva de memória, orientação e raciocínio à medida que o volume cerebral total reduz devido a uma retração e diminuição de processos neuronais, levando a um estado de demência (Mattson 2004; Reddy 2007; Schindowski et al. 2008; Huang & Mucke 2012; Reitz & Mayeux 2014). Sendo uma doença relacionada com o envelhecimento, a maioria dos casos (~95%) ocorre acima de 65 anos de idade e é chamada de forma esporádica devido ao seu desenvolvimento se dar a partir de inúmeros fatores. A outra forma, chamada de DA familiar, ocorre em jovens adultos e possui um forte caráter hereditário, representando 1-5% dos casos (Liu et al. 2013; Reitz & Mayeux 2014; Jack & Holtzman 2013). A DA é a mais prevalente entre as desordens neurodegenerativas, atingindo mais de 26 milhões de pessoas no mundo. Segundo a *American Health Assistance Foundation* (2012) estima-se que esse número deverá aumentar para 65,7 milhões de casos até 2030 e 115,4 milhões em 2050. A incidência da DA aumenta progressivamente com a idade, afetando 25-45% da população acima de 85 anos (Bird TD, 2014; Liu et al. 2013).

Diante desses dados alarmantes, a DA vem sendo extensivamente estudada, porém, ainda não há nenhum tratamento eficaz para prevenir ou reverter os seus sintomas (Huang & Mucke 2012). Evidências mostraram que o grau do dano cognitivo correlaciona-se com a disfunção e degeneração específica de neurônios colinérgicos localizados no complexo colinérgico do

prosencefalo basal (PCB), sendo este um dos eventos chave na patologia desta doença (Schliebs & Arendt 2011; Grothe, Ewers, et al. 2014; Teipel et al. 2014; Nyakas et al. 2011). Além disso, em ambas DA familiar e esporádica, são observadas duas alterações histopatológicas em cérebros de pacientes que caracterizam a doença: os depósitos extracelulares compostos principalmente do peptídeo β -amilóide (β a) em placas senis (ou placas amilóides), e também acúmulos intracelulares da proteína tau hiperfosforilada formando os chamados emaranhados neurofibrilares (NFT) (Adalbert et al. 2007; Schindowski et al. 2008; Pagani & Eckert 2011; Spuch et al. 2012; Giacobini & Gold 2013; Jack et al. 2010).

Mais recentemente, estudos têm mostrado que a perda de sinapses e espinhos dendríticos parece se correlacionar de forma mais precisa com o declínio cognitivo do que a perda de neurônios. De fato, em muitos modelos de DA, a degeneração dos neurônios é precedida por alterações na função sináptica e por atividade neuronal anormal. Portanto, tem-se acreditado que a DA está inicialmente mais relacionada com uma disfunção sináptica causada pelos agregados proteicos do que com a morte neuronal. Os mecanismos precisos que levam a essas mudanças ainda não foram determinados (Jack & Holtzman 2013; Huang & Mucke 2012; Marchetti & Marie 2011; Reitz & Mayeux 2014).

DOENÇA DE ALZHEIMER E O SISTEMA COLINÉRGICO

O Prosencefalo Basal (PCB) (figura 1) é a principal área de projeção colinérgica do Sistema Nervoso Central (SNC), compreendendo, entre outras

estruturas, o septo medial e o núcleo basal de Meynert. Sobretudo, neurônios do septo medial inervam predominantemente o hipocampo, que desempenha um importante papel na consolidação de memória e orientação espacial, características alteradas na DA (Kasa et al. 1997; Oda & Nakanishi 2000; Schliebs & Arendt 2006b; Schliebs & Arendt 2011). Inúmeros estudos já forneceram evidências de déficits pré-sinápticos e atrofia severa nessa região em pacientes com DA (Francis et al. 1999; Nyakas et al. 2011; Grothe, Ewers, et al. 2014; Grothe, Schuster, et al. 2014; Baker-Nigh et al. 2015).

Como ilustrado na figura 1, em neurônios colinérgicos, a acetilcolina (ACh) é sintetizada pela enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) (E.C. 2.3.1.195) e armazenada em vesículas pelo Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT). Com a exocitose vesicular, o neurotransmissor é liberado na fenda sináptica e é rapidamente degradado pela Acetilcolinesterase (AChE) (E.C. 3.1.1.7) em acetato e colina (Fisher & Wonnacott 2012). A ChAT é uma enzima restrita a estruturas pré-sinápticas, sendo assim, o marcador adequado para identificação de neurônios colinérgicos nos sistemas nervoso central e periférico (Phillis 2005; Gabrielle, Jeana, and Lorenza 2003). As mudanças no sistema colinérgico, durante a progressão da DA, podem ser evidenciadas através de alterações nos níveis dessas proteínas como principais marcadores celulares. A atividade dessas enzimas e a liberação do neurotransmissor estão diminuídas, assim como os níveis de receptores muscarínicos e nicotínicos. Ainda, afirma-se que a síntese e liberação de ACh são afetadas na presença de peptídeos β -amilóides (Nyakas et al. 2011; Schliebs & Arendt 2011).

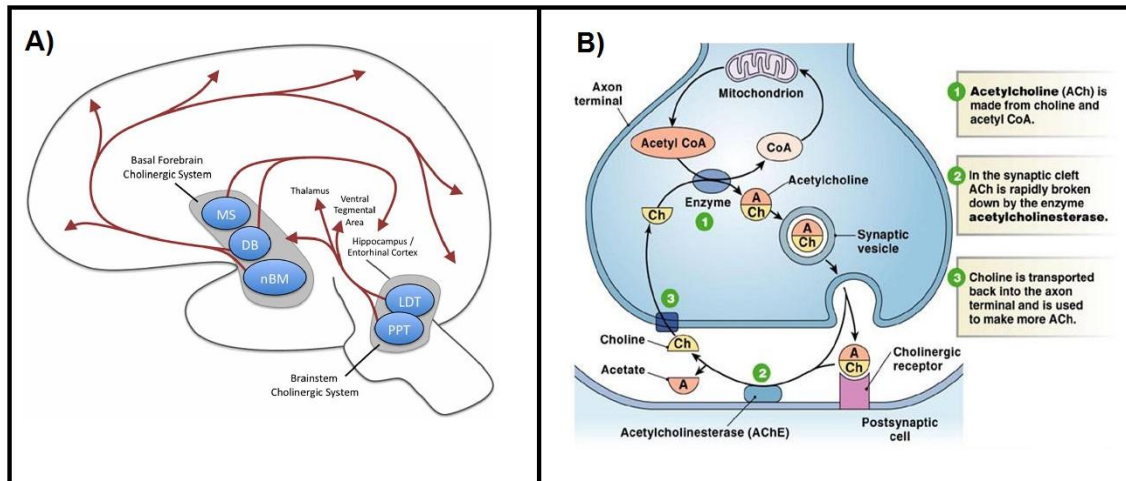


Fig. 1: Esquemas ilustrativos mostrando em (A) as principais projeções colinérgicas no SNC e em (B) uma sinapse colinérgica. O Prosencéfalo Basal (*Basal Forebrain*) é formado pelo núcleo septal medial (MS), bandas diagonais de Broca (DB) e o núcleo basal magnocelular (nBM) ou núcleo basal de Meynert. Adaptado de Newman et al. (2012) e Silverthorn (2006).

BIOMARCADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Na DA, múltiplas proteínas sofrem alterações que induzem uma disfunção e a aquisição de um potencial patogênico e acumulam intracelular ou extracelularmente em neurônios. Como visto, histologicamente, a neurodegeneração é assinalada por dois tipos de lesões: NFT e depósitos extracelulares de β -amilóide.

TAU

Os NFT são agregados de proteínas mal enoveladas, constituídos principalmente pela proteína tau em seu estado hiperfosforilado, que se deposita intracelularmente e se correlacionam de maneira positiva com a severidade da demência (Forman et al. 2004; Müller et al. 2010; Reddy 2011; Giacobini & Gold 2013; Fulga et al. 2007). A tau, produto do gene MAPT, é uma proteína expressa em neurônios que estabiliza a polimerização dos

microtúbulos no axônio (Adalbert et al. 2007; Schindowski et al. 2008). A síntese correta de microtúbulos é essencial para a manutenção de processos de transporte axonal e depende parcialmente do estado de fosforilação da tau, já que quando fosforilada ela é menos efetiva, pois essa alteração causa uma redução na sua afinidade pelos microtúbulos (Schindowski et al. 2008; Bamburg & Bloom 2010). Na DA, a proteína tau hiperfosforilada desprende-se dos microtúbulos e passa a acumular-se no soma (figura 2). A tau não está presente em dendritos, mas atua ativamente nas porções distais dos axônios. Portanto, essas modificações na proteína promovem a disfunção axonal, bloqueando o transporte e impedindo o fluxo normal das sinapses nos neurônios afetados (Fulga et al. 2007; Melov et al. 2007; Higuchi et al. 2002).

A proteína tau possui aproximadamente 79 sítios de fosforilação (Matsuo et al. 1994). A regulação desse processo ocorre através de um balanço entre as atividades das proteínas fosfatases e cinases. Uma diminuição na atividade de fosfatases, principalmente PP1 e PP2A, tem sido relacionada com a fosforilação anormal da proteína tau. Além disso, cinases como a CDK5 pode fosforilar determinados sítios que permitem que a proteína tau se torne um melhor substrato para outras cinases, como a GSK3 β . Cérebros de pacientes com DA *post mortem* mostram níveis de expressão aumentados dessas cinases (Matsuo et al. 1994; Martin et al. 2013; Higuchi et al. 2002).

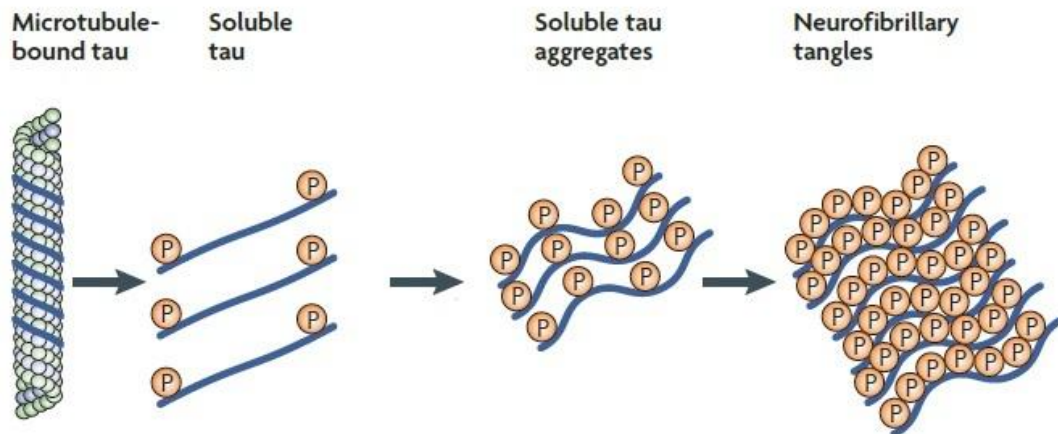


Fig. 2: Imagem ilustrativa mostrando a formação de emaranhados neurofibrilares. Adaptado de Citron (2010).

β -AMILÓIDE

Os peptídeos β a, principais componentes das placas senis, são um produto da clivagem anormal da APP (Proteína Precursora Amilóide) como mostrado na figura 3. A APP é uma glicoproteína integral de membrana sintetizada no soma de neurônios e transportada pelos axônios para os terminais nervosos (Kang et al. 2011; Pagani & Eckert 2011; Spuch et al. 2012; Casley et al. 2002). O processo de clivagem pode ocorrer pela via não-amiloidogênica ou pela amiloidogênica. A APP é clivada no meio do domínio β a pela α -secretase na via não-amiloidogênica gerando, assim, produtos não tóxicos.

Mutações nos genes APP, PSEN1 e PSEN2 estão relacionados principalmente com a DA familiar e são conhecidas por alterarem o processamento do APP e, conseqüentemente, a produção de β -amilóide, promovendo a agregação e acúmulo no cérebro através da via amiloidogênica (Zhang 2004; Huang & Mucke 2012). Na via amiloidogênica, a clivagem da

APP ocorre pela enzima β -secretase no início do domínio β -amilóide e gera fragmentos N-terminal solúveis (sAPP β) e C-terminal de 99 resíduos (C99). Posteriormente, esse fragmento C99 é clivado pelo complexo γ -secretase, do qual as proteínas presenilinas fazem parte (produtos dos genes PSEN1 e PSEN2), formando peptídeos β a de 40 (A β ₁₋₄₀) ou 42 (A β ₁₋₄₂) aminoácidos. (Seeman & Seeman 2011; Casley et al. 2002; Pagani & Eckert 2011; Spuch et al. 2012; Schindowski et al. 2008; Kang et al. 2011; Adalbert et al. 2007; Reddy 2011; Jack & Holtzman 2013). Os peptídeos β a tem uma grande propensão a agregar-se, formando espécies tóxicas de diversas formas como dímeros, oligômeros e fibrilas (figura 3) e os terminais sinápticos parecem ser seus principais alvos iniciais (Ittner & Götz 2011; Spires-Jones & Hyman 2014).

A forma A β ₁₋₄₂ parece ser a forma mais tóxica e que se agrega mais rápido. Recentemente, um consenso crescente sobre a toxicidade das formas oligoméricas vem crescendo (Ittner & Götz 2011). As placas amilóides são agregados formados principalmente por formas fibrilares insolúveis de β a que não parecem ter correlação com a severidade da demência clinicamente. Evidências agora sugerem que oligômeros de β a possuem um papel maior na neurotoxicidade que as fibrilas (Lambert et al. 1998; Klein 2002; Ladiwala et al. 2012; Cleary et al. 2005). Oligômeros são formas solúveis que precedem a formação de fibrilas e acredita-se estar envolvida com a disfunção sináptica em estágios iniciais da doença, causando a perda de espinhos dendríticos também (Ittner & Götz 2011; Cleary et al. 2005; Rushworth et al. 2013). Os mecanismos pelos quais os oligômeros induzem a disfunção sináptica não estão bem elucidados. Oligômeros induzem um desbalanço na homeostase do cálcio,

desencadeiam cascatas moleculares através da interação e modulação de receptores excitatórios, podendo reduzir a eficácia das sinapses.

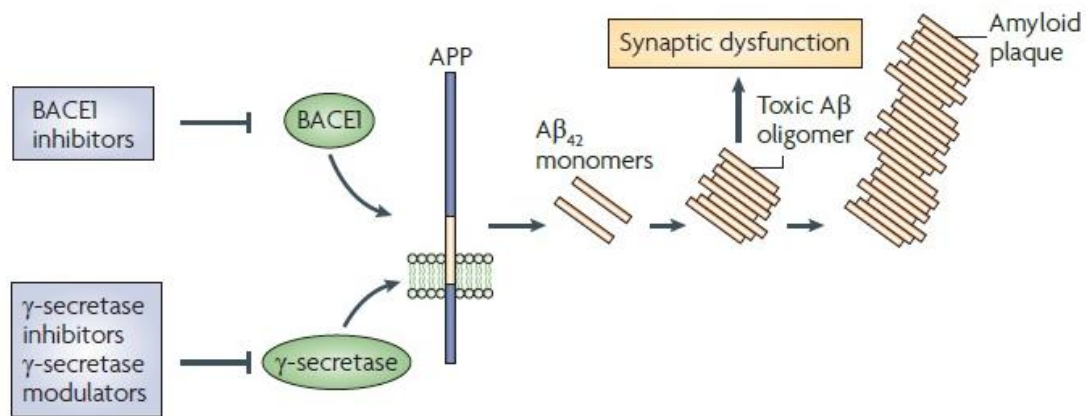


Fig. 3: Esquema ilustrativo mostrando a formação de placas amilóides a partir da agregação de oligômeros de β a. Os oligômeros são postulados como as formas mais tóxicas de β a e responsáveis pela disfunção sináptica. Adaptado de Citron (2010).

HIPÓTESES PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Baseado nos eventos fisiopatológicos, três hipóteses foram formuladas a respeito da causa primária que leva ao dano cognitivo da DA. A hipótese mais antiga sugere que a DA inicia com uma deficiência colinérgica na sinalização, desencadeando a progressão da doença (Whitehouse et al. 1981; Francis et al. 1999; Schliebs & Arendt 2011; Szutowicz et al. 2013; Zhang 2004; Baker-Nigh et al. 2015). Mais recentemente, a partir de estudos de casos de DA familiar, a hipótese amilóide, proposta com base na descoberta de mutações genéticas que alteravam, de alguma forma, a clivagem da APP e, por consequência, a produção de peptídeos β -amilóides (Hardy & Higgins 1992; Kawahara 2010; Karran et al. 2011; Huang & Mucke 2012) proporcionou grandes avanços na área. A hipótese de que a proteína tau é o fator inicial da cascata de degeneração foi proposta a partir da observação de que os depósitos de placas amilóides não correlacionam bem com a perda neuronal

(Karie N Dahlgren et al. 2002; Giacobini & Gold 2013; Jack & Holtzman 2013; Rosenblum 2014).

A partir dessas hipóteses, a formação de depósitos de tau hiperfosforilada e de peptídeos β -amilóide em células neuronais que levam ao dano cognitivo encontrado na DA já foram extensamente estudados. No entanto, existe uma grande dificuldade em unir esses dois eventos patológicos em um único modelo da doença usando células neuronais humanas. Muitos estudos se concentram em apenas uma das hipóteses existentes, ou então os modelos utilizados não reproduzem todos os eventos chaves da doença (Wang et al. 2002; Agholme et al. 2010; Kamat et al. 2013).

Recentemente, Choi et al. (2014) reproduziu, com sucesso, placas amilóides e emaranhados neurofibrilares em um sistema humano neural 3D. No entanto, a linhagem utilizada por Choi e coautores, é uma linhagem neural de células-tronco imortalizada que, além do cultivo e a diferenciação se estenderem por um período muito longo (mínimo de 3 semanas), as células ReNcell VM apresentam características dopaminérgicas quando diferenciadas (Pai et al. 2012; Donato et al. 2007). O sistema colinérgico apresenta características específicas que o torna de vital importância para reproduzir um modelo de DA. Neurônios colinérgicos são particularmente mais vulneráveis a inúmeras neurotoxinas que outras células neurais (Szutowicz et al. 2000). Sobretudo, estudos apontam que uma deposição intraneuronal de β -amilóide parece ser um traço mais seletivo de neurônios colinérgicos da região do PCB. Ainda, peptídeos β -amilóide afetam um *pool* genético colinérgico específico, causando prejuízos à sinalização colinérgica, entre outros mecanismos,

inibindo a enzima ChAT (Mattson & Pedersen 1999; Schliebs & Arendt 2011; Nunes-Tavares et al. 2012; Grothe, Ewers, et al. 2014; Baker-Nigh et al. 2015).

Assim como outras células neurais, neurônios colinérgicos utilizam acetil-CoA para a obtenção de energia, no entanto, estes exigem quantidades maiores de acetil-CoA para a síntese de acetilcolina, tornando-se, portanto, mais sensíveis a mudanças metabólicas (Szutowicz et al. 2013). Acúmulos de β -amilóide intraneuronal já foram descritos e causam danos ao complexo IV mitocondrial podendo assim, comprometer o metabolismo glicolítico (Lin & Beal 2006; Bobba et al. 2013). Isso é um dado interessante, visto que, além de depósitos de tau e β -amilóide, outro biomarcador é a diminuição do metabolismo de glicose em cérebros de paciente com DA (Jack & Holtzman 2013; Forster et al. 2012).

Neurônios colinérgicos, principalmente a via que se projeta do PCB, possuem um papel central em funções cognitivas como aprendizado e memória. Essa via é especialmente afetada na DA, onde ocorre a degeneração desses neurônios, causando os sintomas relacionados à demência (Oda 1999; Schliebs & Arendt 2006a; Nyakas et al. 2011). Portanto, estudos direcionados para marcadores colinérgicos são capazes de proporcionar conhecimentos sobre as condições fisiopatológicas desses neurônios quando acometidos pela DA. A ChAT e a AChE são enzimas responsáveis pela síntese e degradação de ACh, respectivamente, tornando-se marcadores adequados de neurônios colinérgicos. Outro marcador bastante específico, é o VAcHT, que armazena o neurotransmissor em vesículas até ser liberado na fenda sináptica. A colina resultante da degradação é recaptada para o terminal pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) e pode ser reutilizada como

precursor para sintetizar ACh (Fisher & Wonnacott 2012). Esse sistema de síntese e degradação da ACh, onde não há participação de células gliais, é bastante característico de neurônios colinérgicos.

MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Embora os mecanismos moleculares que levam a DA estejam bem caracterizados, ainda não há uma cura para a doença e nem um consenso sobre o seu evento inicial. Parte dessa dificuldade é devido à falta de modelos experimentais cuja fisiopatologia se assemelhe mais a da DA. Além disso, diversos estudos no campo das neurociências são limitados pelo uso de modelos *in vitro* que não se assemelham a neurônios maduros funcionalmente. Portanto, o desenvolvimento de modelos ainda se faz bastante relevante.

Modelos transgênicos foram desenvolvidos com base nos achados de estudos das formas juvenis e hereditária da DA, principalmente em mutações nos genes APP, PSEN1, PSEN2 que mimetizam a patologia amiloidogênica. Entretanto, nenhum deles reproduz totalmente todos os eventos chave da doença, como NFT, por exemplo. Contudo, esses modelos têm contribuído bastante para a compreensão da toxicidade do β a (Elder et al. 2010; Nussbaum et al. 2013).

Modelos *in vitro* são de grande importância para o estudo da DA visto a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos. Células-tronco neurais podem ser isoladas do SNC de adultos e cultivadas, são responsivas a fatores de crescimento e também podem ser diferenciadas a linhagens gliais e

neurônais. Com um pouco menos de problemas éticos, a introdução de métodos que produzem células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *inducible Pluripotent Stem Cells* - iPS) permite a geração de células neuronais com o fenótipo do paciente doador. No entanto, a maioria dos protocolos de diferenciação são muito longos e possuem um rendimento muito baixo quando se trata de células com propriedades funcionais (Suksuphew & Noisa 2015; Mariano et al. 2015; Campos et al. 2014; Zhang et al. 2014; Hossini et al. 2015; Nieweg et al. 2015). O uso de linhagens tumorais se tornou limitado pela falta de modelos que sejam mais semelhantes com neurônios maduros funcionalmente. Inúmeras tentativas de diferenciar essas linhagens em células mais semelhantes a neurônios foram realizadas, resultando apenas na expressão parcial de características neuronais (Cassilano, 2009; Agholme et al, 2010).

Entre as principais neurotoxinas utilizadas para mimetizar as características da DA *in vitro* ou *in vivo* estão o próprio β -amilóide e o ácido ocadáico (AO). O β a tem sido usado em tratamentos tanto *in vitro* quanto em modelos animais para indução da DA, mas grande parte dos estudos aborda a patologia amiloidogênica através de mutações genéticas (Elder et al. 2010). Já o ácido ocadáico é uma toxina isolada primeiramente de esponjas marinhas e é conhecida por ser um potente inibidor de fosfatases de Serinas/Treoninas. Essa inibição causa alterações na proteína tau, promovendo a sua hiperfosforilação e deposição intraneuronal em NFT, levando a neurodegeneração e danos cognitivos similares a DA. No entanto, poucos estudos *in vitro* relatam deposição de β a, focando-se especialmente na tauopatia (Zimmer & Portela 2011; Kamat et al. 2012; Kamat et al. 2013).

Portanto, atualmente, um dos grandes obstáculos nesse campo parece ser a falta de modelos experimentais adequados que sejam capazes de reunir os dois principais eventos patológicos da DA em um único modelo celular humano.

A LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

As células do neuroblastoma humano SH-SY5Y são derivadas do sistema nervoso simpático e se encontram em estágios imaturos de desenvolvimento. Dependendo do tratamento, estas células podem ser diferenciadas em diversos fenótipos neuronais (Påhlman et al. 1995). Previamente nosso grupo de pesquisa estabeleceu as melhores condições experimentais para a diferenciação dopaminérgica dessas células. A redução do soro fetal bovino (SFB) para 1% conjuntamente com o tratamento com ácido retinóico (AR) resulta no surgimento de neuritos e expressão de marcadores neuronais, como a tirosina hidroxilase, enolase específica de neurônio, proteína de núcleo de neurônio e o transportador de dopamina (Lopes et al. 2010; Lopes et al. 2012). Ainda, tem sido descrito que a diferenciação por AR induz a expressão do receptor TrkB, tornando as células responsivas ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Kaplan et al. 1993; Påhlman et al. 1995; Arcangeli et al. 1999; Edsjö et al. 2003). Fatores de crescimento são proteínas que regulam diversos aspectos da função celular, incluindo sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação (Friedman 2012). Estudos relatam que o BDNF desempenha um papel crucial na formação de memória e aprendizado, regulando processos de plasticidade neuronal, e

ainda, seus níveis aparecem reduzidos no hipocampo e neocortex de pacientes portadores de DA (Schindowski et al, 2008; Iwasaki et al, 2012). Portanto, o BDNF é uma molécula alvo de pesquisas no campo das desordens neurodegenerativas. Alguns estudos sugerem que a adição de BDNF pode potencializar os efeitos do AR nas células SH-SY5Y, levando a um maior prolongamento dos neuritos e a uma diferenciação ainda mais madura (Pahlman et al, 1995; Agholme, 2010; Arcangeli et al, 1999; Edsjö et al, 2003; Encinas et al, 2000).

Embora o NGF desempenhe um papel importante na proteção e manutenção de neurônios colinérgicos (Schliebs & Arendt 2011), estudos mostraram que o tratamento com BDNF induz um aumento no imunoconteúdo de marcadores colinérgicos (Påhlman et al. 1995; Nilbratt et al. 2010; Edsjö et al. 2003). No entanto, existem poucos estudos caracterizando a diferenciação colinérgica do neuroblastoma humano SH-SY5Y.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar a diferenciação colinérgica da linhagem celular SH-SY5Y através do tratamento de AR em combinação com o BDNF, a fim de estabelecer um modelo mais adequado para o estudo de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar as diferenças morfológicas e avaliar marcadores neuronais colinérgicos nas células SH-SY5Y diferenciadas conjuntamente com AR e BDNF, comparando com os fenótipos dopaminérgico e proliferativo;
- Avaliar curvas de doses das neurotoxinas AO e β a no fenótipo colinérgico da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y através da viabilidade celular e densidade de neuritos;
- Estabelecer um modelo mais adequado para a DA através da seleção e combinação de doses subletais de AO e β a.

PARTE II

CAPITULO I

MATERIAS E MÉTODOS

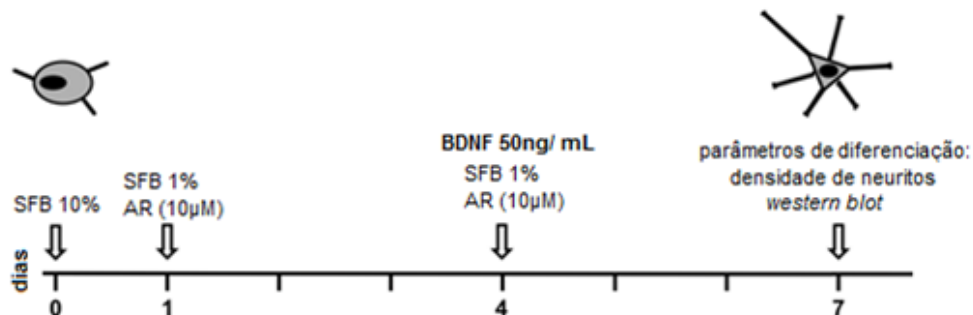
Cultivo Celular e Diferenciação com BDNF

As células proliferativas SH-SY5Y, obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA) foram mantidas a 37°C e 5% CO₂. A linhagem foi cultivada em meio 1:1 de Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) e Ham's F12 (Gibco® Life Technology, Waltham, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de SFB (Cripion Biotecnologia LTDA. Andradina, SP, Brasil), 2 mM de glutamina, 1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina (Gibco® Life Technology). O meio foi trocado a cada 3 dias e as células foram repicadas assim que atingissem 80% de confluência. Após 24h do plaqueamento, a diferenciação neuronal foi induzida pela redução do SFB para 1% e a adição de 10 µM de AR (*all-trans*-retinoic-acid, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) durante 7 dias como estabelecido anteriormente pelo nosso grupo (Lopes et al. 2010). Esse tratamento foi repostado a cada 3 dias para reabastecer o AR no meio de cultura. Para comparar os efeitos do BDNF, foi realizado o mesmo tratamento com AR e 50 ng/mL da neurotrofina foram adicionados no quarto dia de diferenciação (figura 4). Esse tempo escolhido foi baseado em dados da literatura que mostram que o AR é capaz de induzir a expressão de receptores TrkB funcionais nos primeiros dias de tratamento das células do neuroblastoma SH-SY5Y (Kaplan et al. 1993; Edsjö et al. 2003).

BDNF human (ProSpec-Tany TechnoGene Ltda, Rehovot, Israel) foi utilizado para preparar a solução estoque dissolvendo-se a neurotrofina em

uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 0,1% na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Modelo *in vitro* de Diferenciação Colinérgica



Modelo *in vitro* Doença de Alzheimer

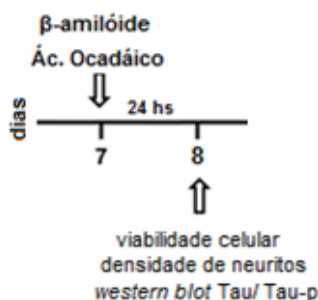


Fig. 4: Protocolo de diferenciação colinérgica. As células proliferativas são semeadas e cultivadas em meio suplementado com SFB 10% por 24 horas para completa adesão. A diferenciação é induzida após adesão celular com a redução do SFB para 1% e a adição de 10 μM de AR, sendo este considerado o primeiro dia. O BDNF foi adicionado no quarto dia, junto com a reposição de AR. Para caracterização do modelo *in vitro* da DA, curva de doses foram realizadas com AO e βa no sétimo dia. Análises morfológicas e bioquímicas foram realizadas 24 h após os tratamentos.

Análise Morfológica

Densidade de Neuritos

Para avaliar as diferenças nos parâmetros morfológicos em células diferenciadas apenas com AR ou AR com BDNF, foram analisadas imagens de

imunofluorescência e contraste de fase obtidas utilizando um microscópio Nikon ECLIPSE TE300 acoplado a câmera digital Nikon DXM1200C.

Para o experimento, as células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 6×10^5 células/poço. A fixação foi realizada com uma solução 1:1 metanol:TCA 20% durante 20 minutos e a permeabilização com PBS-Triton 0,2%. Ligações não específicas foram bloqueadas com BSA 1% por 1h em temperatura ambiente. Após lavagens, o anticorpo anti- β -Tubulina III (Alexa Fluor[®]488) (Abcam, Cambridge, MA, EUA) foi incubado durante 1h30 (1:500). β -Tubulina III é uma proteína específica de neurônios encontrada tanto no soma quanto em neuritos. Em seguida, o corante nuclear Hoescht 33258 (Molecular Probes[®] Life Technologies, Waltham, Massachusetts, EUA) foi adicionado (1 μ g/ μ L). Por fim, 5 campos foram selecionados aleatoriamente e fotografados. Os dados foram analisados com o software NIS-elements (Nikon). A densidade de neuritos foi avaliada utilizando o software AutoQuant Neurites (versão em R), e expressa como unidades arbitrárias (U.A.).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células SH-SY5Y foram semeadas sobre lamínulas em uma densidade de 6×10^5 células/poço. Após a diferenciação, as lamínulas foram destinadas a fixação por imersão em glutaraldeído 25% por uma semana. Logo após esse período, o material foi lavado com Tampão Fosfato 0,2 M e desidratado em seguidas lavagens que usavam de Acetona 30% a 100%. A dessecação é realizada em um aparelho de Ponto Crítico (BALZERS CPD030). A metalização foi feita com alvo de ouro (SPUTTER COATER, BALZERS SCD050).

Meta-Análise de bancos de expressão gênica

A série de dados GSE9168 de microarranjo foi obtida através do repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) utilizando as palavras chave “SH-SY5Y”, “RA” e “BDNF”. Essa série de dados disponibiliza a variação da expressão gênica durante a diferenciação neuronal pelo ácido retinóico e pela combinação de ácido retinóico e BDNF, de dois subtipos de células SH-SY5Y; a derivada da *American Type Culture Collection* (ATCC) – SH-SY5Y-A, e da *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) – SH-SY5Y-B. Os dados foram normalizados utilizando o software Affymetrix® Expression Console™ (v.1.1). A lista de genes constituintes da sinapse colinérgica (hsa04725) e dopaminérgica (hsa04728) foram obtidas segundo o banco de dados de rotas do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Após a seleção dos genes, a rede de interação gênica funcional foi gerada segundo *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING) versão 9.0 (<http://string-db.org/>) (figura 4). Para a interpretação dos dados de expressão gênica, nós utilizamos o *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). O GSEA considera experimentos com perfis de expressão de um grupo de genes a partir de amostras que pertencem a duas classes, rotuladas de 1 ou 2. Dado um conjunto definido *a priori* dos genes *S* (aqui, os genes que codificam para a sinapse colinérgica e dopaminérgica), o objetivo do GSEA é determinar se os membros de *S* são distribuídos aleatoriamente ou enriquecidos em conjunto, na parte superior ou inferior da cauda de distribuição (Subramanian et al. 2005).

Parâmetros Bioquímicos

Atividade enzimática da AChE

Após 24 horas das células SH-SY5Y terem sido semeadas, ou após a diferenciação, a atividade da enzima AChE (E.C 3.1.1.7) foi determinada pelo ensaio colorimétrico descrito por Ellman (1961). As células foram lavadas e ressuspendidas em solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4) e o extrato total de proteína foi incubado com tampão fosfato (pH 7,4) e 10 mM de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) durante cinco minutos. A essa preparação, 8 mM de acetilticolina (Sigma[®]) foi adicionado e a absorbância lida em 412 nm por 10 minutos. Atividade é medida pela reação de grupamentos tióis, liberados da degradação de acetilticolina, com DTNB. Resultados são expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Atividade enzimática da ChAT

A atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) (E.C. 2.3.1.195) foi determinada conforme Chao & Wolfgram (1971) com algumas modificações. Amostras foram incubadas com o tampão de reação (PBS pH 7,2; acetilcoenzima A 6,2 mM; cloreto de colina 1 M, sulfato de neostigmina 0,76 mM; NaCl 3 M; EDTA 1,1 mM). A essa mistura foi adicionado 1 mM de 4,4'-ditiodipiridina (4-PDS) e a absorbância foi lida por 90 minutos a 324 nm em um leitor de microplaca SpectraMax[®] Microplate Reader (Molecular Devices[®]). Atividade é medida pela formação do conjugado de Coenzima A com 4-TP. Resultados são expressos em $\text{nmol}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína calculado através do coeficiente de extinção molar 1.98×10^4 .

Western Blot

As células proliferativas ou diferenciadas foram lavadas com PBS e ressuspendidas em Tampão de Lise (Tris 5 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,01%, pH

7,4) com inibidor de protease (Roche[®]) e de fosfatase (NaF 10 mM) (Sigma[®]). O extrato total de proteína foi separado por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e então transferido para uma membrana de PVDF. Ligações não específicas foram bloqueadas com BSA 5% em TTBS por uma hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anti-ChAT (1:500) (Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-DAT (1:5000) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), Anti-Tau (1:500), anti-phospho-Tau Ser396-404 (1:1000), (Abcam), anti-phospho-Tau Ser202-199 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) ou anti- β -actina (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, EUA).

Após as lavagens, a membrana foi incubada com anticorpos secundários (1:5000) (DaKo[®] Polyclonal Rabbit Anti-Mouse e Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP) por duas horas a temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas com Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate (PIERCE[®]) em um ImageQuant LAS 4000[™] (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, USA).

Preparo dos oligômeros solúveis do peptídeo β -amilóide

Peptídeos β a humanos (Abcam[®]) foram diluídos em 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma[®]) em uma concentração de 1mM e incubadas a temperatura ambiente por 1h. As alíquotas foram mantidas em uma capela de fluxo laminar *overnight* para que o HFIP evaporasse. Possíveis resíduos foram removidos em um aparelho SpeedVac (Christ RVS 2-18) por 10 minutos. Os tubos dessecados foram guardados a -20°C. Para cada ensaio, uma alíquota foi descongelada e diluída em DMSO para uma solução de 5 mM. Essa solução foi novamente diluída em PBS e incubada a 4°C por 24h. Após a

incubação, a solução foi centrifugada a 14000g por 10 minutos e o sobrenadante coletado (Klein 2002; Stine et al. 2003; Karie N. Dahlgren et al. 2002).

Western Blot de Oligômeros solúveis do peptídeo β a

Os oligômeros solúveis do peptídeo β a foram preparados conforme anteriormente descrito, segundo Klein (2002). Para confirmação do preparo, os oligômeros solúveis foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida glicina não desnaturante 12%. O gel foi corado com uma solução de Coomassie G250 (Sigma[®]) (Coomassie.0,08%; H₃PO₄ 1,6%; (NH₄)₂SO₄ 8%, Metanol 20%).

Ensaio de Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade induzida por Ácido Ocadáico (AO) ou oligômeros solúveis do peptídeo β -amilóide (β a) em células SH-SY5Y diferenciadas com adição de BDNF foi determinada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). A redução do MTT a sal de formazan pelas desidrogenases foi quantificada. As células foram tratadas com uma curva de dose de AO ou β a e após 24h de tratamento, foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT durante 1h a 37°C. DMSO foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi determinada a 560nm e 630nm em um leitor de placa (SoftMax Pro, Molecular Devices, USA).

Quantificação de Proteína

A quantificação de proteínas para Western Blot foi realizada pelo ensaio de Lowry (Lowry, 1951). Demais técnicas foram realizadas através do ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em triplicata. Múltiplas comparações foram realizadas pelo teste ANOVA, com significância mínima de $P < 0.05$. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando-se do programa GraphPad[®] (San Diego, CA, USA, versão 5.0).

CAPITULO II

RESULTADOS

Com o intuito de caracterizar a diferenciação colinérgica, avaliamos a morfologia através de análises de densidade de neuritos e marcadores bioquímicos através de análises de imunoconteúdo e atividades enzimáticas. Em seguida, para padronizar um modelo apropriado da DA, avaliamos a viabilidade celular e determinamos doses subletais de AO e β a nas células SH-SY5Y diferenciadas com adição de BDNF. Posteriormente, estas doses foram combinadas em um único tratamento para, assim, obtermos um modelo *in vitro* da DA que possa ser usado para *screening* de drogas com potenciais neuroprotetores.

Análise Morfológica

Densidade de neuritos e MEV

Como previamente descrito pelo nosso grupo, a diferenciação com AR, em combinação com a diminuição do SFB para 1%, induz uma inibição do crescimento celular e uma mudança na morfologia das células SH-SY5Y para um fenótipo tipo neuronal. Analisando as imagens obtidas tanto por microscopia de contraste de fase e fluorescência quanto por MEV, observamos que as células que receberam o tratamento com adição de BDNF demonstraram uma notável morfologia neuronal, apresentando neuritos em maior densidade, mais prolongados e com maior ramificação (figura 5). Por outro lado, as células em crescimento exponencial (proliferativas) mantiveram uma morfologia típica epitelial.

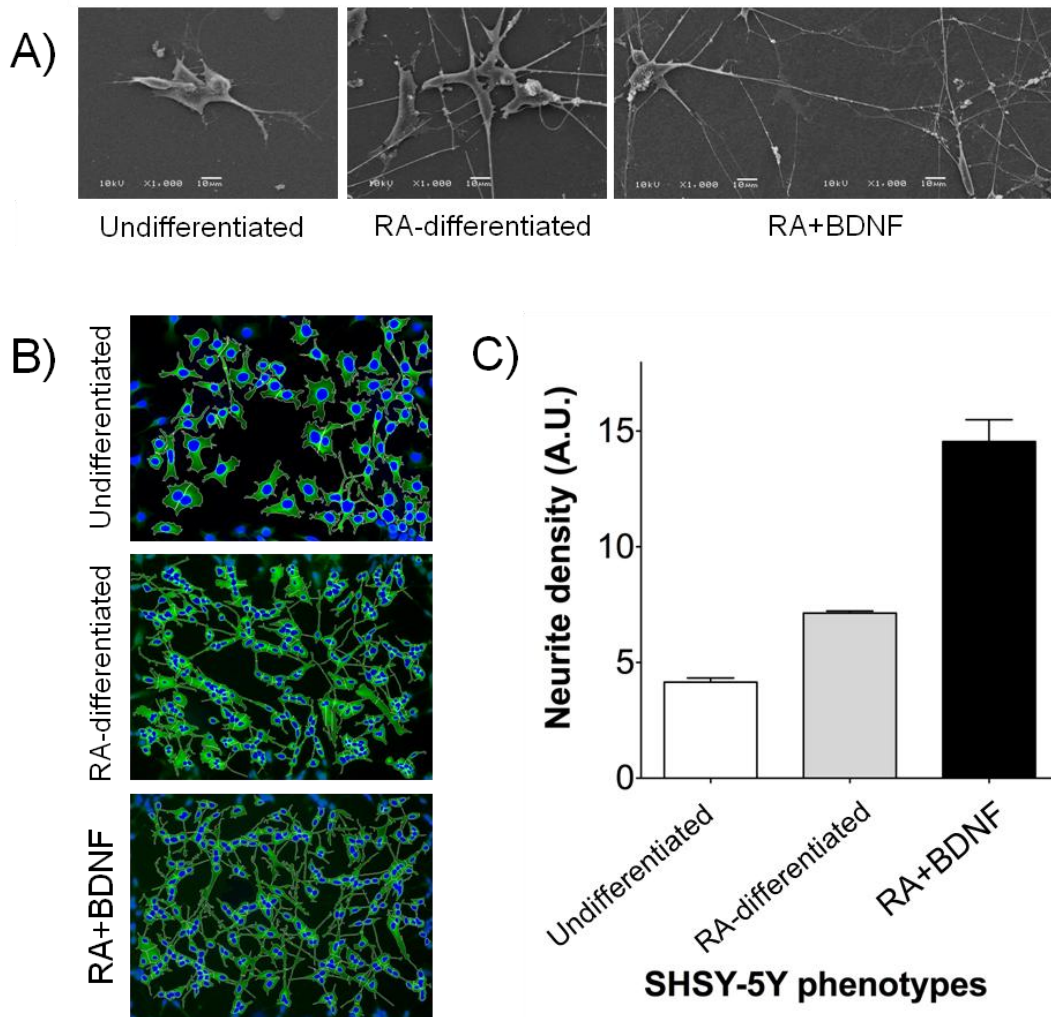


Figura 5: Análise morfológica. (A) Imagens representativas realizadas através de microscopia eletrônica de varredura de células proliferativas, diferenciadas por sete dias com AR e cotratadas com BDNF. (B) Imagens representativas de imunofluorescência de células SH-SY5Y proliferativas, diferenciadas com AR e cotratadas com BDNF. Marcação fluorescente em verde para β -tubulina III específica de neurônios, evidenciando os neuritos, sobreposta à marcação nuclear com Hoechst 33258 (200X). (C) Histograma representando a quantificação automatizada de neuritos gerada através do software AutoQuant Neurite® (MCK soluções em Patologia Digital Ltda).

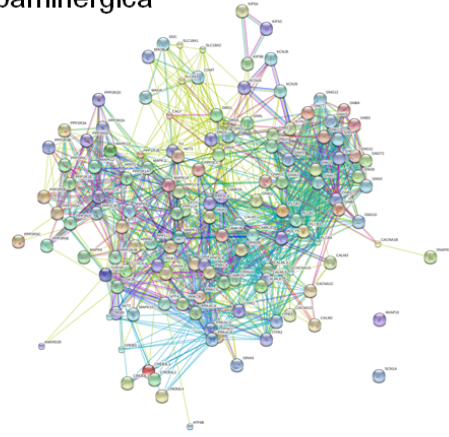
A)

Sinapse Colinérgica



B)

Sinapse Dopaminérgica



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

Gene	Descrição
ITPR1	receptor inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 1
KCNJ2	canal de recaptação de potássio, subfamília J, membro 2
ADCY3	adenilato ciclase 3
GNG5	proteína G, gama 5
ADCY1	adenilato ciclase 1 (cérebro)
ADCY7	adenilato ciclase 7
PIK3CA	fosfoinositideo-3-cinase, catalítico, alfa polipeptideo
GNG4	proteína G, gama 4
ATF4	fator ativador de transcrição 4
ITPR3	receptor inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 3
SLC18A3	família de carreadores de solutos 18 (acetilcolina vesicular), membro 3
PIK3R2	fosfoinositideo-3-cinase, subunidade regulatória 2, (p85 beta)
GNB1	proteína G, polipeptideo beta 1
ADCY5	adenilato ciclase 5
AKT2	oncogene viral de timoma murino homólogo 2 (v-akt) cálcio/calmodulina-dependente proteína cinase
CAMK2B	(CaM cinase) II beta
GNB5	proteína G, beta 5
GNAI1	polipeptideo inibidor alfa 1 de proteína G
NRAS	oncogene viral de neuroblastoma homólogo RAS (v-ras)
KCNJ3	canal de recaptação de potássio, subfamília J, membro 3
CAMK4	cálcio/calmodulina-dependente proteína cinase (CaM cinase) IV
CHRNA3	receptor colinérgico, nicotínico, alfa 3
GNAI2	polipeptideo inibidor alfa 2 de proteína G
CHRNA6	receptor colinérgico, nicotínico, alfa 3
PLCB1	fosfolipase C, beta 1 (fosfoinositideo-específico)
FYN	oncogene FYN relacionado com SRC, FGR, YES
CHRN4	receptor colinérgico, nicotínico, beta 4
GNG3	proteína G, gama 3

Dados de expressão foram obtidos da plataforma GSE9168, com n = 3 para cada condição. A significância foi obtida pela análise de enriquecimento de grupo de genes (GSEA) nos grupos comparados.

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

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

Dados de expressão foram obtidos da plataforma GSE9168, com n = 3 para cada condição. A significância foi obtida pela análise de enriquecimento de grupo de genes (GSEA) nos grupos comparados.

Figura 6: Efeito do protocolo de diferenciação sobre a expressão gênica. Expressão diferencial de genes da sinapse colinérgica e dopaminérgica mediados pelo tratamento com AR e BDNF na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os genes que compõem a Rede de interação gênica da sinapse colinérgica (A) e dopaminérgica (B) avaliados neste estudo e os genes que apresentaram modulação significativa em sua expressão pelo tratamento com AR e BDNF em comparação ao tratamento com AR.

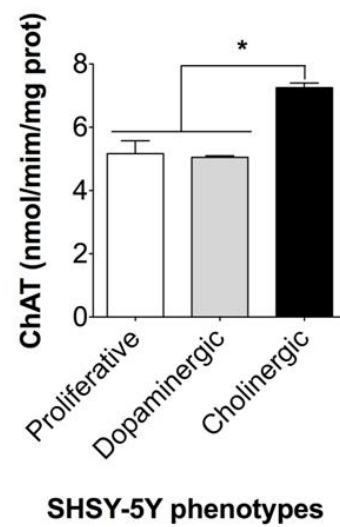
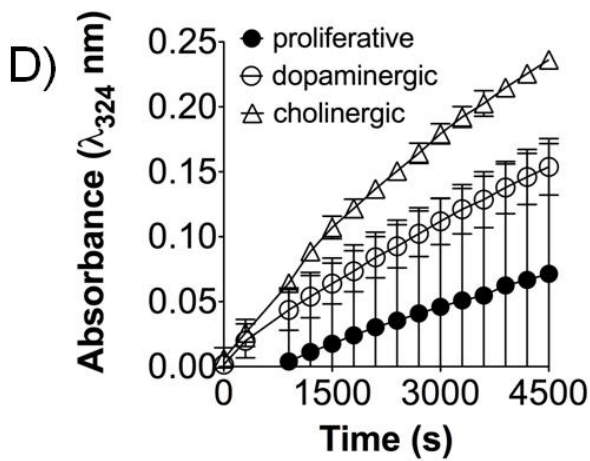
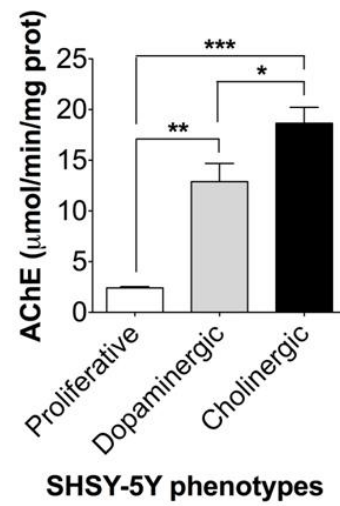
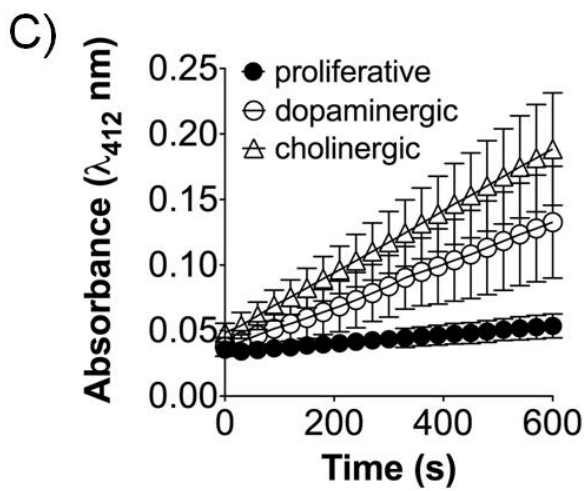
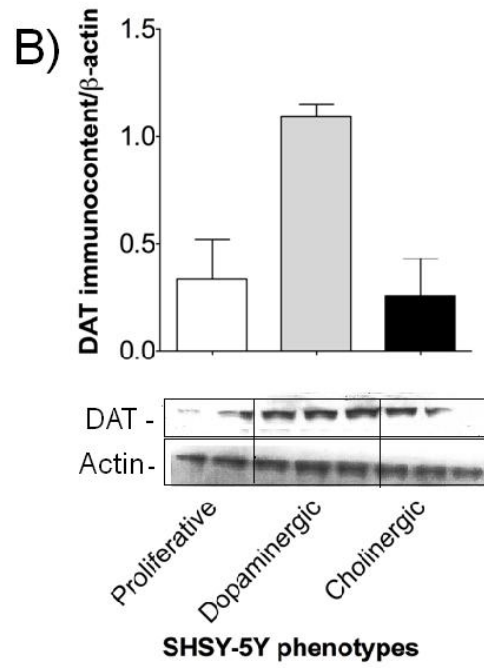
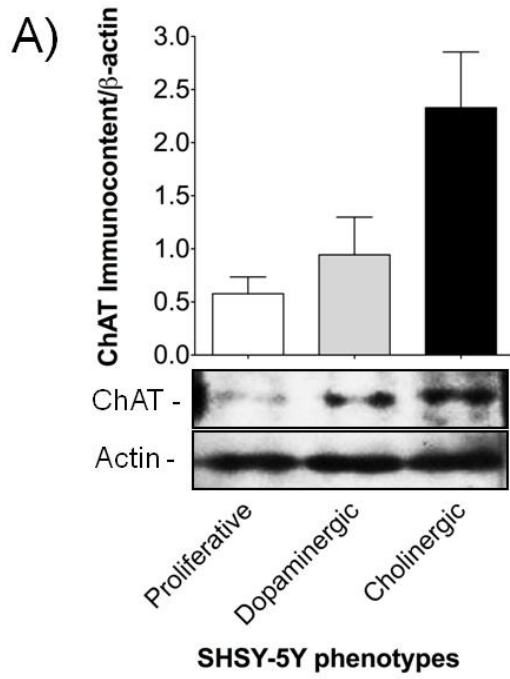


Figura 7: Efeitos da diferenciação sobre atividade enzimática de marcadores colinérgicos. (A) Densitometria e imagem representativa de *Western Blot* do marcador de neurônios colinérgicos. Dados apresentados como média \pm DP de três experimentos. (ANOVA, $*p < 0,05$). (B) Densitometria e *Western Blot* do marcador de neurônios dopaminérgicos. Análise das bandas representada por média \pm DP de três experimentos independentes (C) Atividade da AChE determinada pela cinética de formação de grupamentos de sulfidrilas (-SH) liberados da degradação de acetilcolina durante dez minutos. Dados apresentados como média \pm DP para quatro experimentos independentes realizados em triplicatas (ANOVA $*p < 0,05$ $**p < 0,01$ $***p < 0,001$). (D) Atividade da ChAT determinada pela cinética da formação do conjugado CoA e 4-TP durante 90 minutos. Dados apresentados como média \pm DP para quatro experimentos independentes realizados em duplicatas. (ANOVA $***p < 0,001$).

Meta-Análise de bancos de expressão gênica

O efeito dos diferentes protocolos de diferenciação sobre a expressão de genes relacionados com a sinapse colinérgica e dopaminérgica foi analisada. Quando avaliamos o padrão de expressão gênica do tratamento com AR e BDNF em comparação ao tratamento com AR, foi verificado um aumento significativo na expressão de vários genes marcadores de sinapse colinérgica com a concomitante diminuição na expressão de genes marcadores de sinapse dopaminérgica (figura 6).

Análise Bioquímica

A partir dos dados obtidos nas análises morfológicas e a meta-análise de bancos de expressão gênica entre células SH-SY5Y tratadas com AR e tratadas com AR e BDNF, avaliamos o imunoconteúdo e atividade funcional de marcadores colinérgicos nos diferentes fenótipos.

Western Blot

Encontramos um aumento no imunoconteúdo da ChAT em células co-tratadas com BDNF quando comparadas a células diferenciadas somente com AR (figura 7A). Além disso, uma diminuição no imunoconteúdo de DAT (Transportador de Dopamina), marcador de neurônios dopaminérgicos, foi detectada nas células diferenciadas com adição de BDNF quando comparado às células tratadas apenas com AR (figura 7B). Confirmando, portanto, que o protocolo de diferenciação com BDNF induz um fenótipo predominantemente colinérgico na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y.

Atividades Enzimáticas

Em seguida, assim que observamos o aumento no imunoconteúdo da proteína ChAT, verificamos se esse aumento também poderia ser funcional. As atividades enzimáticas de marcadores de neurônios colinérgicos (AChE e ChAT) em cada um dos grupos experimentais foram analisadas. Na figura 7C é possível observar que o tratamento com AR já induz um aumento na atividade da AChE, em relação as células proliferativas. E quando o BDNF foi adicionado à diferenciação das células, encontramos um aumento significativo na atividade da AChE ($p < .05$) em relação àquelas tratadas apenas com AR. Da mesma forma, encontramos diferenças na atividade da ChAT. Verificamos um aumento mais evidente na atividade desta enzima no grupo co-tratado com BDNF, quando comparado às células diferenciadas somente com AR e com as proliferativas. No entanto, as células diferenciadas com AR e as proliferativas não apresentaram diferenças significativas entre si. (figura 7D).

Neurotoxicidade

O estabelecimento da diferenciação colinérgica foi o primeiro passo para padronizar o modelo *in vitro* de DA visto que esses neurônios são os primeiros a serem acometidos pela doença. A partir disso passamos a estabelecer as doses e a combinação das neurotoxinas que são indutoras dos eventos patológicos da DA.

Efeito do tratamento com AO sobre a Viabilidade Celular e Densidade de Neuritos

O efeito do inibidor de fosfatases AO e de oligômeros solúveis do peptídeo β a foram avaliados mediante ensaio de MTT. As células foram tratadas com diversas concentrações de AO (figuras 8A e 8C) e foi possível estabelecer uma toxicidade dose-dependente onde a DL50 se estabeleceu em torno 36 nM e as doses subletais selecionadas foram 5 nM e 10 nM, cuja viabilidade celular permaneceu em torno de 99% e 80%, respectivamente. Ainda, como visto na figura 8D, quando as células passaram pelo tratamento com AO, estas apresentaram uma perda na densidade neurítica também dose-dependente, semelhante a viabilidade celular.

Avaliamos o Imunoconteúdo de Tau em células SH-SY5Y tratadas com AO 5 nM e 10 nM. As amostras foram coletadas como já descrito e o imunoconteúdo de Tau Total, fosfo-Tau Ser202 e fosfo-Tau Ser396 foram avaliados. Apenas para fosfo-Tau Ser202 foi observado um aumento significativo (figura 8E).

Efeitos do tratamento com β a sobre a Viabilidade Celular e Densidade de Neuritos

Avaliamos o tratamento com uma curva de dose de fibrilas de β a, que, através do ensaio de MTT, atingiu uma DL50 aproximadamente em 35 μ M (figura 9B). Por outro lado, não houve alteração significativa na viabilidade

celular quando o tratamento foi realizado com os oligômeros solúveis de β a mesmo em concentrações de 100 nM (figura 9C e 9E).

No entanto, quando avaliamos a densidade de neuritos através da quantificação da marcação fluorescente para β -tubulina III (figura 9C), uma perda significativa de projeções citoplasmáticas foi observada nas células tratadas com os oligômeros solúveis de β a em todas as concentrações testadas (figura 9F).

Co-tratamento

Depois de estabelecido as doses subletais de cada toxina, as células foram co-tratadas com as concentrações selecionadas de AO e β a, a fim de estabelecer um modelo mais adequado para o estudo da Doença de Alzheimer. Curiosamente, as doses selecionadas dos oligômeros solúveis apenas mostraram efeito no ensaio de MTT quando combinadas com as doses de AO (figura 10).

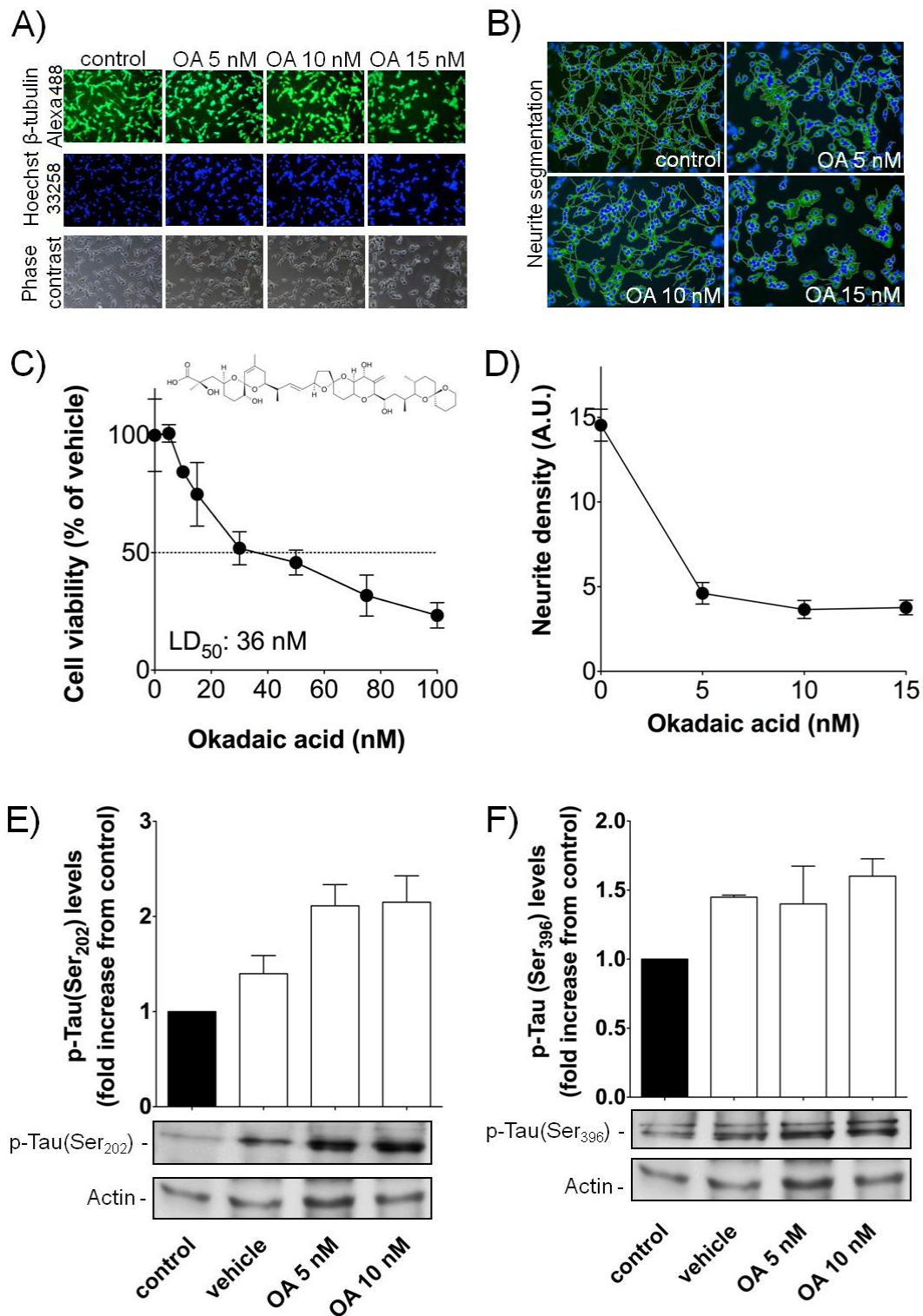


Figura 8: Citotoxicidade do AO em células SH-SY5Y diferenciadas com AR e BDNF. Células foram tratadas com uma curva de doses de Ácido Ocadáico por 24hs. (A) Imagens representativas de células diferenciadas tratadas com AO 5 nM, 10 nM e 15 nM com marcação fluorescente para β -tubulina III em verde, evidenciando os neuritos. Marcador (200X). (B) Sobreposição das marcações para β -tubulina III e Hoechst 33258 e segmentação realizada pelo Software AutoQuant Neurites. (C) A citotoxicidade da droga foi avaliada pelo ensaio de

MTT. Dados apresentados como média \pm DP para quatro experimentos independentes realizados em triplicatas. (ANOVA * $p < 0,05$). (D) Efeitos da toxicidade do tratamento com AO sobre a densidade de neuritos. Densitometria e imagem representativa de *Western Blot* do imunocnteúdo de Tau hiperfosforilada. Membranas foram testadas para (E) p-Tau Ser202 e (F) p-Tau Ser396. Análise das bandas representada por média \pm DP de dois experimentos independentes.

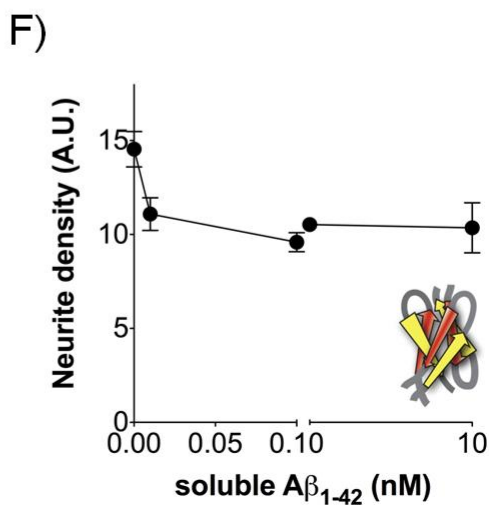
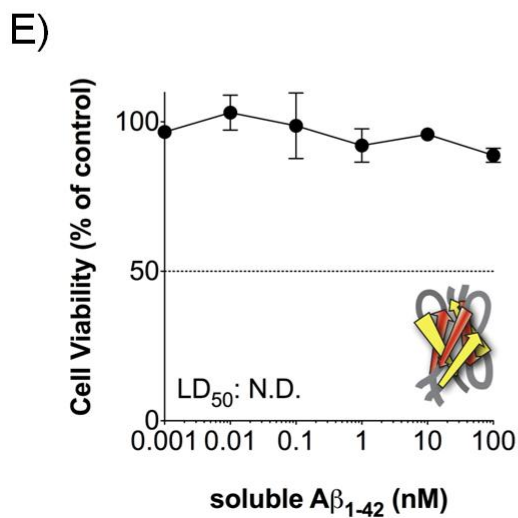
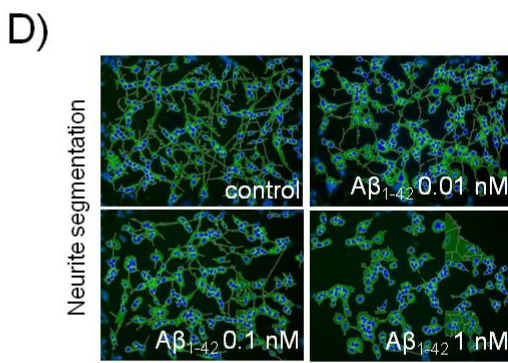
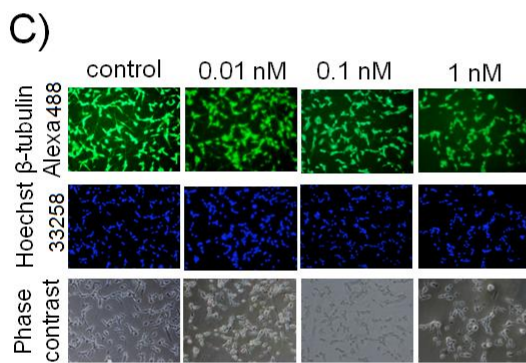
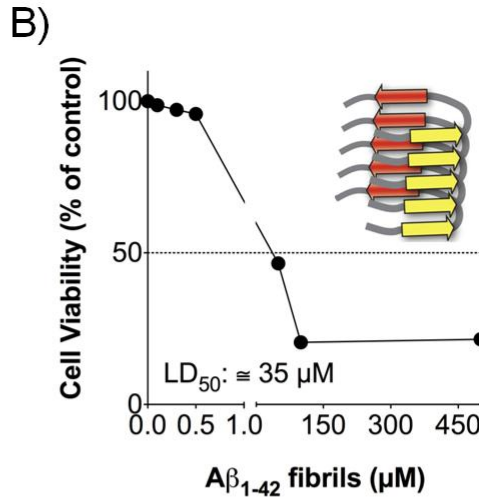
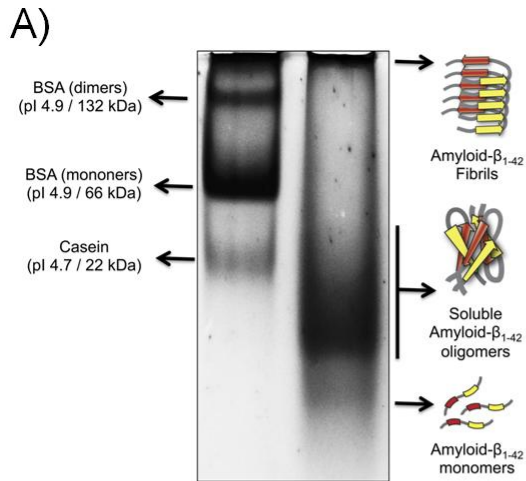


Figura 9: Neurotoxicidade frente ao peptídeo β a (1-42). Células foram tratadas com diferentes concentrações de oligômeros solúveis ou fibrilas do peptídeo β a (1-42) por 24hs. (A) *Western Blot* da preparação de oligômeros solúveis a partir de β a (1-42) segundo Klein (2002). (B) A neurotoxicidade das fibrilas de β a foi avaliada usando o ensaio de MTT. Dados apresentados como média \pm DP para três experimentos independentes realizados em triplicatas. (ANOVA * $p < 0,05$). (C) Imagens representativas do efeito do tratamento com oligômeros solúveis de β a em células diferenciadas cotratadas com BDNF (200X). Marcação fluorescente para β -tubulina III e núcleos corados com Hoechst 33258. (D) Segmentação das imagens de marcações fluorescentes realizada pelo Software AutoQuant Neurites® para posterior quantificação. (E) Viabilidade celular frente ao tratamento com oligômeros solúveis de β a determinada pelo ensaio de MTT. Dados apresentados como média \pm DP para três experimentos independentes realizados em triplicatas. (ANOVA * $p < 0,05$). (F) Gráfico representando a quantificação da densidade de neuritos por corpo celular, mostrando o efeito neurotóxico do tratamento com β a.

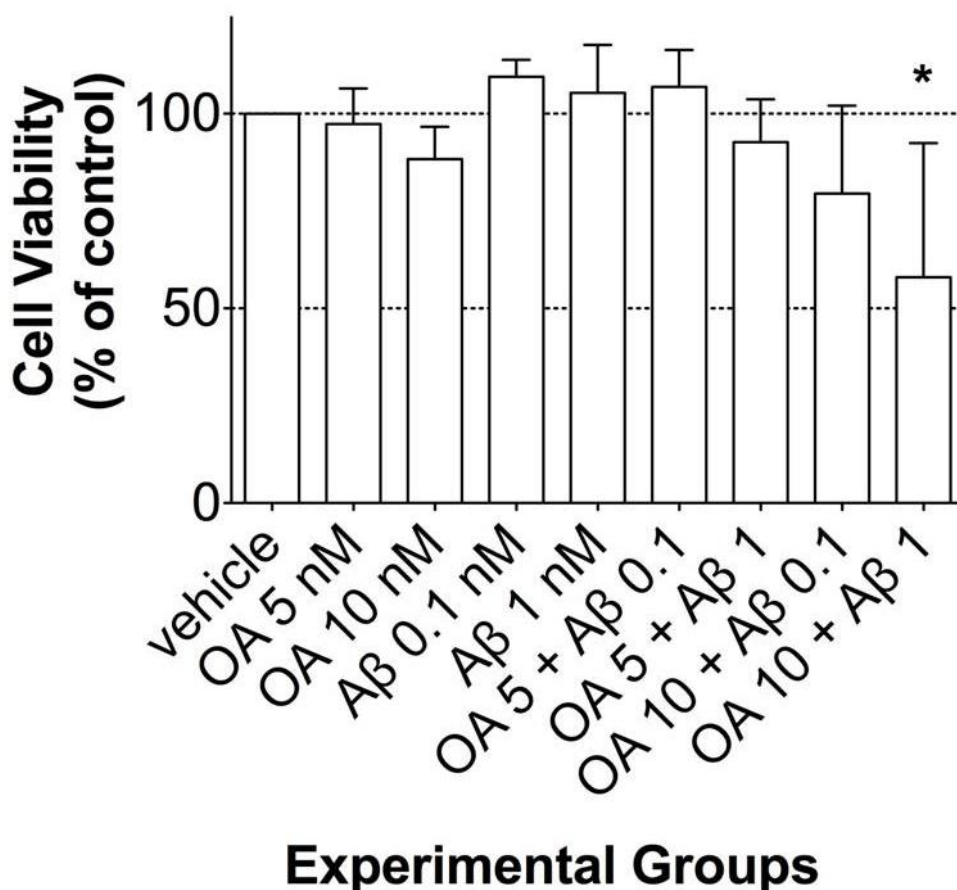


Figura 10: Efeito da combinação de doses subletais de AO e oligômeros de β a. Células foram tratadas em uma combinação das doses de 5 nM e 10 nM de Ao com 0,1nM e 1nM de β a por 24 h. A citotoxicidade das drogas foi

avaliada usando o ensaio de MTT. Dados apresentados como média \pm DP para três experimentos independentes realizados em duplicatas.

PARTE III

DISCUSSÃO

Freqüentemente são utilizados modelos *in vitro* que não apresentam neuritos, não possuem sinapses completas, ou não são capazes de expressar proteínas humanas (ex.: no caso de culturas primárias derivadas de roedores), e mesmo algumas linhagens imortalizadas carecem de traços específicos de neurônios maduros (ex.: SH-SY5Y, PC12, ReNcell VM). Embora a diferenciação para distintos fenótipos torne os modelos mais relevantes, são poucos os estudos prévios que caracterizam a diferenciação colinérgica do neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os efeitos do AR na diferenciação neuronal das células SH-SY5Y já foram bem descritos anteriormente (Adem et al. 1987; Pålman et al. 1995). O AR induz modificações fenotípicas notavelmente visíveis nesta linhagem celular, como emissão de projeções citoplasmáticas, redução da proliferação, expressão de marcadores dopaminérgicos e de diferenciação neuronal (Lopes et al. 2010). Curiosamente, embora o sistema simpático do qual essas células derivam, não possua receptores para BDNF, o tratamento com AR estimula a expressão de receptores TrkB funcionais (Kaplan et al. 1993). A partir disso, as células SH-SY5Y se tornam responsivas ao BDNF e, como visto neste trabalho, tem a atividade de marcadores colinérgicos aumentados. Isso evidencia que essa linhagem é capaz de ser diferenciada em diversos fenótipos neuronais maduros sob as condições adequadas. Portanto, ainda existe uma grande necessidade de modelos *in vitro* que sejam capazes de expressar características de células neuronais humanas acometidas pela patologia da DA. A proposta desse trabalho foi estabelecer um modelo *in vitro* mais adequado para posteriormente estudar os mecanismos envolvidos na patofisiologia de doenças neurodegenerativas como a DA.

Neste trabalho, as células SH-SY5Y foram expostas ao tratamento sequencial com AR e BDNF. Isso resultou em células com neuritos mais prolongados e ramificados, (figuras 5A e 5B), corroborando com dados encontrados na literatura (Kaplan et al. 1993; Arcangeli et al. 1999; Encinas et al. 2000). Além disso, através desse tratamento com BDNF, as células SH-SY5Y obtiveram um aumento, não apenas no imunoconteúdo, mas também na atividade enzimática do marcador de neurônios colinérgicos, ChAT, sugerindo, pela primeira vez, que esse aumento pode ser funcional também (figura 7A e 7C). Desse modo, o protocolo de diferenciação apresentado resulta muito provavelmente em um modelo *in vitro* de células neuronais com orientação para um fenótipo colinérgico.

Após a avaliação desses dados, uma meta-análise de bancos de expressão gênica foi realizada. Comparando o tratamento com AR e BDNF com o fenótipo proliferativo da SH-SY5Y, observamos que houve um aumento na expressão de genes relacionados a cascatas de sinalização, evidenciando uma maior complexidade metabólica em relação às células proliferativas. Houve também um enriquecimento estatístico para o grupo de genes colinérgicos, principalmente para receptores muscarínicos. O gene que codifica a enzima ChAT surge aumentado com o co-tratamento com BDNF, corroborando com os dados encontrados neste trabalho (dados não demonstrados). Por outro lado, o gene que codifica a proteína MAO B mostrou-se diminuído no tratamento AR e BDNF. A MAO B pertence à família de flavinas monoamina oxidase. É uma enzima localizada na membrana mitocondrial externa, que catalisa a desaminação oxidativa de aminas,

preferencialmente benzilamina e feniletilamina, mas também degrada o neurotransmissor dopamina (Gnegy 2012).

Quando comparamos o grupo AR e BDNF com AR observamos um enriquecimento na rede colinérgica relacionado às células co-tratadas com BDNF. Diversos genes que codificam receptores colinérgicos mostraram-se aumentados, tanto muscarínicos quanto nicotínicos. A expressão do gene SLC18A3, também encontrou-se aumentada. A proteína transmembrana codificada por esse gene, conhecida como VAChT, transporta acetilcolina em vesículas secretoras para serem liberadas no espaço extracelular. Esse gene é localizado dentro do primeiro íntron do gene da ChAT. O gene FYN também foi encontrado nas células tratadas com AR e BDNF com sua expressão aumentada. Este gene codifica a proteína Fyn, uma tirosina cinase associada à membrana, cujo papel tem sido relacionado com controle do crescimento celular. Sabe-se que Fyn também está presente na via de sinalização de integrinas. Mais recentemente, essa proteína tem sido associada ao receptor TrkB. O BDNF ativa receptores TrkB, recrutando-os para compartimentos intracelulares localizadas em balsas lipídicas. Sugere-se que essa translocação seja crucial para o funcionamento correto da cascata de sinalização iniciada pelas neurotrofinas. Estudos observaram que o BDNF promove a associação de TrkB com a proteína Fyn durante a translocação para as balsas lipídicas. Além disso, em modelos nocaute para o gene FYN, BDNF foi incapaz de direcionar TrkB para esses domínios de membrana. Isso sugere que Fyn seja essencial para a ativação completa dos receptores TrkB, mesmo após a ligação com BDNF (Pereira & Chao 2007). Sendo assim, é possível inferir que as células proliferativas, que não possuem expressão aumentada do gene

FYN, são incapazes de expressar receptores TrkB funcionais. (Påhlman et al. 1995). Esses dados vão de encontro aos resultados obtidos neste estudo, visto que a diferenciação colinérgica induzida por BDNF só pode ser disparada após o pré-tratamento com AR. Portanto, a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y pode se transformar em uma poderosa ferramenta, sendo de grande utilidade para o estudo *in vitro* em neurociências, principalmente em doenças neurodegenerativas.

No entanto, para se estudar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DA, ainda é preciso que esse modelo apresente características que mimetizem os danos causados pelo acúmulo de β a e de e tau hiperfosforilada.

Depois de estabelecida a diferenciação para um fenótipo colinérgico, as células SH-SY5Y foram desafiadas com uma curva de dose das neurotoxinas β a ou AO. Através do tratamento com AO foi possível estabelecer uma DL50 aproximadamente de 36 nM (figura 8C). Como visto, a redução na densidade de neuritos acompanha a diminuição da viabilidade celular de uma maneira dose-dependente. Isso corrobora com dados na literatura que indicam que a hiperfosforilação da tau, e sua posterior deposição, está relacionada com a degeneração de neurônios em cérebros de pacientes de DA, sendo utilizada como um biomarcador (Reitz & Mayeux 2014; Jack et al. 2010; Jack & Holtzman 2013). É possível que as duas lesões características da DA ocorram independentemente uma da outra. NFT já foram descritos em outras desordens, formando uma classe de doenças neurodegenerativas que podem ser chamadas de Taupatias, onde, em sua maioria, nenhuma delas apresenta acúmulos de β a. Assim como na DA, os indivíduos acometidos também apresentam dano cognitivo. Assim como os NFT, as placas amilóides também

já foram descritas sem necessariamente ocorrer deposição da proteína tau, no entanto, depósitos de β a podem ser vistos em cérebros de pacientes que envelheceram sem danos cognitivos (Selkoe 2001).

Por outro lado, quando as células SH-SY5Y foram tratadas com β a, não houve diferença significativa na viabilidade celular entre as concentrações utilizadas. Surpreendentemente, como pode ser observado nas figuras 9E e 9F, as doses utilizadas no ensaio de MTT que não resultaram em perda da viabilidade celular, quando avaliada a densidade neurítica, estas mesmas causaram uma diminuição drástica nas ramificações. No entanto, o corpo celular dos neurônios permaneceu visivelmente intacto após o tratamento, sugerindo que as desidrogenases que metabolizam o MTT a sal de formazan ainda estivessem ativas. Muitos estudos alegam que as placas amilóides não possuem correlação com a severidade do dano cognitivo (Huang & Jiang 2009; Rosenblum 2013; Reitz & Mayeux 2014; Ittner & Götz 2011). Por isso, o diagnóstico através das placas amilóides é um pouco controverso. Por outro lado, evidências surgiram nos últimos anos sobre os oligômeros de β a e sua sinaptotoxicidade. Oligômeros podem existir independentes de placas amilóides e estudos mostraram, através de mecanismos ainda desconhecidos, que essas formas de β a estão presentes principalmente nos terminais sinápticos, causam alterações na liberação de neurotransmissores, induzem uma agregação anormal de outras proteínas, como a Tau e a AChE (Kawahara 2010; Jack & Holtzman 2013; Klein 2013). Nos últimos anos, oligômeros vêm sendo intensamente estudados e muitos outros dados interessantes foram descobertos que poderiam explicar a disfunção sináptica. Esses agregados de β a são responsáveis por formar canais de cálcio na membrana celular,

permitindo a entrada do íon e desestabilizando a homeostase (LaFerla 2002; Kawahara 2010; Rhee et al. 1998). Recentes mecanismos sugerindo uma interação entre oligômeros, transportadores e receptores glutamatérgicos, envolvidos nas sinapses excitatórias, podem contribuir para o dano sináptico e perda de memória relacionado a DA (Li et al. 2009; Li et al. 2011; Koffie et al. 2011; Danysz & Parsons 2012).

As doses baixas das neurotoxinas usadas nos tratamentos das células SH-SY5Y foram escolhidas com o objetivo de posteriormente selecionar uma que não compromettesse a funcionalidade basal das células, com o intuito de estudar os mecanismos que levam a degeneração inicial. Portanto, embora não tenhamos detectado uma hiperfosforilação da proteína tau, um aumento no imunoconteúdo das proteínas fosforiladas na Ser-202 em comparação com o controle foi observado. O AO é uma neurotoxina com a ação de inibir as fosfatases 1 e 2A responsáveis pela defosforilação da proteína tau, provavelmente, as baixas doses de 5nM e 10nM não foram suficientes para inibi-las. Além disso, muitos estudos discordam sobre o papel inicial dos sítios fosforilados da proteína tau. Su et al. (1994) mostrou que a fosforilação anormal poderia surgir inicialmente no sítio Ser-202 em neuritos distróficos antes da Ser-396. Como não houve uma perda significativa da densidade de neuritos nas concentrações selecionadas, é possível que não tenham sido suficientes para induzir uma maior fosforilação no sítio Ser-396. Outras doses devem ser testadas.

Ainda, um estudo mais recente mostrou que a morte neuronal induzida por oligômeros de β a revelou grandes fragmentos da proteína tau, não necessariamente hiperfosforilados. Estudos recentes também indicaram que a

proteína tau se acumula na forma de oligômeros antes da formação de NFT e que também existe uma correlação com neurodegeneração (Lasagna-Reeves et al. 2012; Reifert, 2011).

Oligômeros de β a já foram identificados em diferentes estágios da DA, e estudos sugerem que poderiam ser utilizados como biomarcadores em estágios iniciais da doença (Amaro et al. 2013). Combinando doses subletais de AO e β a seria possível estabelecer um modelo de DA que apresentasse os dois eventos patológicos característicos da doença em apenas 24h. A combinação de doses subletais de AO e oligômeros de β a no tratamento de células SH-SY5Y diferenciadas, sem causar uma grande perda de viabilidade celular, poderia proporcionar um modelo *in vitro* capaz de mimetizar a fisiopatologia de neurônios colinérgicos inicialmente acometidos pela DA.

Clifford (2013) propôs modelos temporais dos marcadores de DA esporádica. Em um deles, os autores sugerem que a taupatia, indicadora de degeneração e dano cognitivo, surge como causa primária em indivíduos idosos, mas encontra-se abaixo do limiar de detecção. A deposição de β a surge independentemente e torna-se detectável antes dos sintomas clínicos e da neurodegeneração. Em geral, a detecção da DA ocorre em um estágio muito avançado da doença, onde a reversão ou inibição da progressão encontra grandes desafios. O estabelecimento de modelos da DA nos primeiros estágios da desordem, quando os sintomas clínicos ainda não são perceptíveis, tornaria possível estudar os mecanismos que levam a causa primária da doença.

Além disso, o modelo *in vitro* aqui proposto poderá servir para a realização de *screening* de novas drogas neuroprotetoras que sejam capazes de reverter ou inibir o avanço dos eventos fisiopatológicos em estágios.

CONCLUSÃO

Com os dados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o modelo *in vitro* proposto para a DA através da diferenciação celular em um fenótipo colinérgico do neuroblastoma humano SH-SY5Y e co-tratamento com neurotoxinas é um modelo adequado para estudos de mecanismos moleculares e *screening* de drogas e compostos que tenham potencial protetor em doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adalbert, R., Gilley, J. & Coleman, M.P., 2007. Abeta, tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection. *Trends in molecular medicine*, 13(4), pp.135–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17344096> [Accessed December 2, 2013].
- Adem, a et al., 1987. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Brain research*, 430(2), pp.235–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3607514>.
- Agholme, L. et al., 2010. An In Vitro Model for Neuroscience : Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. , (20), pp.1069–1082.
- Amaro, M. et al., 2013. Initial stages of beta-amyloid A β 1–40 and A β 1–42 oligomerization observed using fluorescence decay and molecular dynamics analyses of tyrosine. *Methods and Applications in Fluorescence*, 1(1), p.15006. Available at: <http://stacks.iop.org/2050-6120/1/i=1/a=015006>.
- Arcangeli, a et al., 1999. Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: potentiating effects of BDNF. *Journal of neurobiology*, 40(2), pp.214–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413451>.
- Baker-Nigh, a. et al., 2015. Neuronal amyloid- accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*. Available at: <http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awv024>.
- Bamburg, J.R. & Bloom, G.S., 2010. Cytoskeletal Pathologies of Alzheimer Disease. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(8), pp.635–649.
- Bobba, A. et al., 2013. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by beta-amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion*, 13(4), pp.298–311.
- Campos, P.B., Paulsen, B.S. & Rehen, S.K., 2014. Accelerating neuronal aging in in vitro model brain disorders: a focus on reactive oxygen species. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(October), pp.1–10. Available at: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fnagi.2014.00292/full>.
- Casley, C.S. et al., 2002. Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *Journal of neurochemistry*, 80(1), pp.91–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796747>.

- Choi, S.H. et al., 2014. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13800>.
- Citron, M., 2010. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(5), pp.387–398. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2896>.
- Cleary, J.P. et al., 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nature neuroscience*, 8(1), pp.79–84.
- Dahlgren, K.N. et al., 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid peptides differentially affect neuronal viability. *The Journal of biological chemistry*, 277(35), pp.32046–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058030> [Accessed November 6, 2013].
- Dahlgren, K.N. et al., 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *The Journal of biological chemistry*, 277(35), pp.32046–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058030> [Accessed November 6, 2013].
- Danysz, W. & Parsons, C.G., 2012. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), pp.324–352.
- Donato, R. et al., 2007. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC neuroscience*, 8, p.36.
- Edsjö, A. et al., 2003. Expression of trkB in Human Neuroblastoma in Relation to MYCN Expression and Retinoic Acid Treatment. , 83(6), pp.813–823.
- Elder, G.A., Gama Sosa, M.A. & De Gasperi, R., 2010. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 77(1), pp.69–81.
- Encinas, M. et al., 2000. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated , Neurotrophic Factor-Dependent ,.
- Fisher, S.K. & Wonnacott, S., 2012. *Chapter 13 - Acetylcholine*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749475000134> [Accessed April 11, 2015].
- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M., 2004. OUR TENTH YEAR Neurodegenerative diseases : a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. , 10(10), pp.1055–1063.

- Forster, S. et al., 2012. Regional expansion of hypometabolism in Alzheimer's disease follows amyloid deposition with temporal delay. *Biological psychiatry*, 71(9), pp.792–797.
- Francis, P.T. et al., 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer ' s disease : a review of progress. , pp.137–147.
- Friedman, W., 2012. *Chapter 29 - Growth Factors*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749475000298> [Accessed April 11, 2015].
- Fulga, T.A. et al., 2007. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nature cell biology*, 9(2), pp.139–48.
- Gabrielle, P., Jeana, M. & Lorenza, E.C., 2003. Cytosolic choline acetyltransferase binds specifically to cholinergic plasma membrane of rat brain synaptosomes to generate membrane-bound enzyme. *Neurochemical Research*, 28(3-4), pp.543–549.
- Giacobini, E. & Gold, G., 2013. Alzheimer disease therapy--moving from amyloid- β to tau. *Nature reviews. Neurology*, 9(12), pp.677–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217510>.
- Gnegy, M.E., 2012. *Chapter 14 – Catecholamines*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749475000146> [Accessed April 13, 2015].
- Grothe, M.J., Schuster, C., et al., 2014. Atrophy of the cholinergic basal forebrain in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease dementia. *Journal of Neurology*, pp.71–73.
- Grothe, M.J., Ewers, M., et al., 2014. Basal forebrain atrophy and cortical amyloid deposition in nondemented elderly subjects. *Alzheimer's and Dementia*, pp.1–10.
- Hardy, J. a & Higgins, G. a, 1992. Alzheimer ' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis.
- Higuchi, M., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M., 2002. Tau protein and tauopathies. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, pp.1339–1354.
- Hossini, A.M. et al., 2015. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. *BMC genomics*, 16(1), p.84.
- Huang, H.C. & Jiang, Z.F., 2009. Accumulated amyloid-?? peptide and hyperphosphorylated tau protein: Relationship and links in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16(1), pp.15–27.

- Huang, Y. & Mucke, L., 2012. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6), pp.1204–1222. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>.
- Ittner, L.M. & Götz, J., 2011. Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(2), pp.65–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193853>.
- Jack, C.R. et al., 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*, 9(1), pp.119–128.
- Jack, C.R. & Holtzman, D.M., 2013. Biomarker modeling of alzheimer's disease. *Neuron*, 80(6), pp.1347–1358. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.003>.
- Kamat, P.K. et al., 2012. Okadaic acid induced neurotoxicity leads to central cholinergic dysfunction in rats. *European journal of pharmacology*, 690(1-3), pp.90–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749976> [Accessed December 10, 2013].
- Kamat, P.K., Rai, S. & Nath, C., 2013. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology*, 37, pp.163–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23688530> [Accessed December 10, 2013].
- Kang, D.E. et al., 2011. The Interface between Cytoskeletal Aberrations and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Experimental Neurobiology*, 20(2), p.67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3213703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kaplan, D.R. et al., 1993. Induction of TrkB by Retinoic Acid Mediates SH.pdf. , pp.321–331.
- Karran, E., Mercken, M. & Strooper, B. De, 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(9), pp.698–712. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3505>.
- Kasa, P., Rakonczay, Z. & Gulyat, K., 1997. The cholinergic system in alzheimer's disease. p 52(62).
- Kawahara, M., 2010. Neurotoxicity of β -amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis. *Current pharmaceutical design*, 16(25), pp.2779–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20698821>.
- Klein, W.L., 2002. A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry International*,

41(5), pp.345–352. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018602000505>.

Klein, W.L., 2013. Synaptotoxic amyloid-beta oligomers: a molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 33 Suppl 1, pp.S49–65.

Koffie, R.M., Hyman, B.T. & Spire-Jones, T.L., 2011. Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), p.63. Available at: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/6/1/63>.

Ladiwala, A.R. a et al., 2012. Conformational differences between two amyloid β oligomers of similar size and dissimilar toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 287(29), pp.24765–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3397903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 9, 2013].

LaFerla, F.M., 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(11), pp.862–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415294> [Accessed November 7, 2013].

Lambert, M.P. et al., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), pp.6448–6453.

Lasagna-Reeves, C.A. et al., 2012. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 26(5), pp.1946–1959.

Li, S. et al., 2011. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(18), pp.6627–6638.

Li, S. et al., 2009. Soluble oligomers of amyloid β -protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, 62(6), pp.788–801.

Lin, M.T. & Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. , 443(October), pp.787–795.

Liu, C.-C. et al., 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature reviews. Neurology*, 9(2), pp.106–18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Lopes, F.M. et al., 2010. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*, 1337, pp.85–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380819> [Accessed October 26, 2012].
- Lopes, F.M. et al., 2012. Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. *Neurotoxicity research*, 22(2), pp.138–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271527> [Accessed December 2, 2013].
- Marchetti, C. & Marie, H., 2011. Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Reviews in the neurosciences*, 22(4), pp.373–402.
- Mariano, E.D. et al., 2015. Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World journal of stem cells*, 7(2), pp.477–482.
- Martin, L. et al., 2013. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing research reviews*, 12(1), pp.39–49.
- Matsuo, E.S. et al., 1994. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*, 13(4), pp.989–1002.
- Mattson, M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), pp.631–639.
- Mattson, M.P. & Pedersen, W.A., 1999. EFFECTS OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN DERIVATIVES AND OXIDATIVE STRESS ON BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC SYSTEMS IN ALZHEIMER | S DISEASE. *Int. J. Devl Neuroscience*, 16, pp.737–753.
- Melov, S. et al., 2007. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PloS one*, 2(6), p.e536. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1888726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 15, 2012].
- Müller, W.E. et al., 2010. Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease--therapeutic aspects. *Molecular neurobiology*, 41, pp.159–171.
- Newman, E.L. et al., 2012. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 6(June), p.24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3374475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 1, 2012].

- Nieweg, K. et al., 2015. Alzheimer's disease-related amyloid-beta induces synaptotoxicity in human iPS cell-derived neurons. *Cell death & disease*, 6, p.e1709.
- Nilbratt, M. et al., 2010. Neurotrophic factors promote cholinergic differentiation in human embryonic stem cell-derived neurons. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(6B), pp.1476–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799651> [Accessed December 2, 2013].
- Nunes-Tavares, N. et al., 2012. Inhibition of choline acetyltransferase as a mechanism for cholinergic dysfunction induced by amyloid- β peptide oligomers. *The Journal of biological chemistry*, 287(23), pp.19377–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505713> [Accessed November 15, 2012].
- Nussbaum, J.M., Seward, M.E. & Bloom, G.S., 2013. Alzheimer disease: a tale of two prions. *Prion*, 7(1), pp.14–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965142>.
- Nyakas, C. et al., 2011. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behavioural brain research*, 221(2), pp.594–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553766> [Accessed November 8, 2012].
- Oda, Y., 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology international*, 49(11), pp.921–937.
- Oda, Y. & Nakanishi, I., 2000. The Distribution of Cholinergic neurons in the human central nervous system. , pp.825–834.
- Pagani, L. & Eckert, A., 2011. Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, p.925050. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3065051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 5, 2012].
- Påhlman, S. et al., 1995. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 31A(4), pp.453–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576944>.
- Pai, S. et al., 2012. Dynamic Mass Redistribution Assay Decodes Differentiation of a Neural Progenitor Stem Cell. *Journal of Biomolecular Screening*, 17(9), pp.1180–1191.
- Pereira, D.B. & Chao, M. V, 2007. The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(18), pp.4859–69.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475794> [Accessed December 2, 2013].

Phillis, J.W., 2005. Acetylcholine release from the central nervous system: a 50-year retrospective. *Critical reviews in neurobiology*, 17(3-4), pp.161–217.

Reddy, P.H., 2011. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain research*, 1415, pp.136–48. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3176990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2013].

Reddy, P.H., 2007. Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons. *Antioxidants & redox signaling*, 9(10), pp.1647–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696767> [Accessed April 30, 2012].

Reifert, J., Hartung-Cranston, D. & Feinstein, S.C., 2011. Amyloid beta-mediated cell death of cultured hippocampal neurons reveals extensive Tau fragmentation without increased full-length tau phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 286(23), pp.20797–20811.

Reitz, C. & Mayeux, R., 2014. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), pp.640–651. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>.

Rhee, S.K., Quist, a P. & Lal, R., 1998. Amyloid beta protein-(1-42) forms calcium-permeable, Zn²⁺-sensitive channel. *The Journal of biological chemistry*, 273(22), pp.13379–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593665>.

Rosenblum, W.I., 2014. Why Alzheimer trials fail: Removing soluble oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult. *Neurobiology of Aging*, 35(5), pp.969–974. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.085>.

Rosenblum, W.I., 2013. Why Alzheimer trials fail: removing soluble oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult. *Neurobiology of aging*, 35(5), pp.969–974. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.085> [Accessed November 15, 2013].

Rushworth, J. V et al., 2013. Prion protein-mediated toxicity of amyloid- β oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. *The Journal of biological chemistry*, 288(13), pp.8935–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3610967&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 17, 2013].

Schindowski, K., Belarbi, K. & Buée, L., 2008. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes, brain, and behavior*, 7

Suppl 1, pp.43–56. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2228393&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2013].

Schliebs, R. & Arendt, T., 2011. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural brain research*, 221(2), pp.555–63. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145918> [Accessed October 31, 2012].

Schliebs, R. & Arendt, T., 2006a. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 113(11), pp.1625–1644.

Schliebs, R. & Arendt, T., 2006b. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 113(11), pp.1625–44. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17039298> [Accessed November 19, 2013].

Seeman, P. & Seeman, N., 2011. Alzheimer's disease: ??-amyloid plaque formation in human brain. *Synapse*, 65(12), pp.1289–1297.

Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. , 81(2).

Spires-Jones, T.L. & Hyman, B., 2014. The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 82(4), pp.756–771. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>.

Spuch, C., Ortolano, S. & Navarro, C., 2012. New Insights in the Amyloid-Beta Interaction with Mitochondria. *Journal of Ageing Research*, 2012.

Stine, W.B. et al., 2003. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 278(13), pp.11612–22. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499373> [Accessed November 6, 2013].

Su, J.H., Cummings, B.J. & Cotman, C.W., 1994. Early phosphorylation of tau in Alzheimer's disease occurs at Ser-202 and is preferentially located within neurites. *Neuroreport*, 5(17), pp.2358–2362.

Subramanian, A. et al., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide. *PNAS*, 102(43), pp.15545–15550.

Suksuphew, S. & Noisa, P., 2015. Neural stem cells could serve as a therapeutic material for age-related neurodegenerative diseases. *World journal of stem cells*, 7(2), pp.502–511.

- Szutowicz, a. et al., 2000. Acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons and their susceptibility to neurotoxic inputs. *Metabolic Brain Disease*, 15(1), pp.29–44.
- Szutowicz, A. et al., 2013. Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. *Neurochemical Research*, 38(8), pp.1523–1542.
- Teipel, S. et al., 2014. Cholinergic basal forebrain atrophy predicts amyloid burden in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(3), pp.482–491. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.029>.
- Wang, H.-W. et al., 2002. Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain research*, 924(2), pp.133–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750898>.
- Whitehouse, P.J. et al., 1981. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of Neurology*, 10(2), pp.122–126.
- Zhang, D. et al., 2014. A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons. *Biomaterials*, 35(5), pp.1420–1428.
- Zhang, X., 2004. Cholinergic activity and amyloid precursor protein processing in aging and Alzheimer's disease. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 3(2), pp.137–152.
- Zimmer, E.R. & Portela, L.V.C., 2011. Efeitos do Pré-Tratamento com Memantina em um Modelo de Neurodegeneração induzida pela administração intra-hipocampal de Ácido Ocadáico em Ratos: Uma Avaliação Comportamental e Neuroquímica.