

Estresse oxidativo em células SH-SY5Y diante da exposição ao peróxido de hidrogênio

Oxidative stress in SH-SY5Y cells on exposure to hydrogen peroxide

Estrés oxidativo en células SH-SY5Y por exposición al peróxido de hidrógeno

Recebido: 02/02/2022 | Revisado: 11/02/2022 | Aceito: 16/02/2022 | Publicado: 22/02/2022

Antonieta Marques Caldeira Zabeu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0138-2250>

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: antonieta.zabeu@gmail.com

Rafaella Rossato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4528-0777>

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: rafaella.rossato@hotmail.com

Cristina Pacheco Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0572-074X>

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: cpsoares@univa.br

Newton Soares da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6452-9278>

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: newton1105@outlook.com

Resumo

O estresse oxidativo é consequência da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio geradas normalmente pelo metabolismo celular. Essa produção excessiva ocasiona a perda de capacidade de defesa e de reparo, levando a danos nas biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas) celulares. Quando estes danos não são reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula, levando-a a morte por apoptose ou necrose. O estresse oxidativo está associado à morte de células neurais como sendo uma das principais causas de doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer e doença de Parkinson. O objetivo deste estudo é verificar a ação do peróxido de hidrogênio sendo um modelo de estresse oxidativo em células de neuroblastoma humano. Busca-se analisar a partir de qual concentração ocorre um estresse significativo nas células e, em conjunto, verificar esse limiar de concentração em diferentes tempos de ação nas células. Os experimentos realizados compreenderam as análises de atividade mitocondrial obtido por meio do teste de corante tetrazólio (MTT), teste de viabilidade celular utilizando o ensaio de azul de tripano, obtendo-se assim dados quantitativos e qualitativos. Foi possível observar que, a partir da concentração de 0,2 mM durante um intervalo de tempo de 2 horas houve uma diminuição significativa no número de células viáveis em relação ao grupo controle. E, acima dessa concentração, em relação ao tempo, ocorreram mais danos celulares.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Peróxido de hidrogênio; Neuroblastoma.

Abstract

Oxidative stress is obtained through the formation of reactive oxygen species, which are normally produced by cell metabolism, but when produced in excess, the cell loses its ability to defend and repair, leading to damage to biomolecules (DNA, lipids, proteins, etc). When these damages are not repaired, they end up compromising the cell's functioning, leading to death by apoptosis or necrosis. Oxidative stress is involved in neural cell death, which is a major cause of neurodegenerative diseases, including Alzheimer and Parkinson's disease. The aim of this study is to verify the action of hydrogen peroxide as a model of oxidative stress in human neuroblastoma cells. In order to analyze from which concentration a significant stress occurs in the cells and together, verify each concentration at different times of action in the cells. The experiments performed were the analysis of mitochondrial activity obtained through the MTT test, cell viability test using the Trypan blue assay, obtaining quantitative and qualitative data. It is possible to observe that from the concentration of 0.2 mM in the time of 2 hours, there is a significant decrease in the number of cells in relation to the control group, therefore, with the increase of the other concentrations in relation to time, more damage occurs in the cells.

Keywords: Oxidative stress; Hydrogen peroxide; Neuroblastoma.

Resumen

El estrés oxidativo se obtiene a través de la formación de especies reactivas de oxígeno, que normalmente son

producidas por el metabolismo corporal, pero cuando se producen en exceso, la célula pierde su capacidad de defensa y reparación, provocando daños en las biomoléculas (ADN, lípidos, proteínas, etc). Cuando estos daños no se reparan, acaban comprometiendo el funcionamiento de la célula, llevándola a la muerte por apoptosis o necrosis. El estrés oxidativo está involucrado en la muerte de las células neurales, que es una de las principales causas de enfermedades neurodegenerativas, incluidas la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson. El objetivo de este estudio es verificar la acción del peróxido de hidrógeno como modelo de estrés oxidativo en células de neuroblastoma humano. Con el fin de analizar a partir de qué concentración se produce un estrés significativo en las células y en conjunto, verificar cada concentración en diferentes tiempos de acción en las células. Los experimentos realizados fueron el análisis de la actividad mitocondrial obtenida a través de la prueba MTT, prueba de viabilidad celular mediante el ensayo de azul de tripano, obteniendo datos cuantitativos y cualitativos. Es posible observar que a partir de la concentración de 0,2 mM en el tiempo de 2 horas, se produce una disminución significativa del número de células con relación al grupo control, por tanto, con el aumento de las demás concentraciones en relación con el tiempo, se produce más daño en las células. **Palabras clave:** Estrés oxidativo; Peróxido de hidrógeno; Neuroblastoma.

1. Introdução

Os radicais livres têm papel muito importante na origem da vida e evolução biológica: estão envolvidos em muitas atividades bioquímicas de células, como transdução de sinal, transcrição de genes e regulação da atividade da guanilato ciclase solúvel. (Mc Cord, 2000). Já é vasta a literatura que evidencia que o estresse oxidativo é determinante em muitas doenças neurodegenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer e de Parkinson. A degeneração neural que ocorre frente à bioquímica e patologia destas doenças coincide com vários marcadores de danos oxidativo (van Muiswinkel & Kuiperij, 2005).

Nos processos biológicos as células obtêm energia através de processos metabólicos oxidativos, que geram subprodutos denominados espécies reativas de oxigênio (ERO). Estes óxidos têm curta duração, pois rapidamente os mecanismos de defesa celular atuam no sequestro, transformação e diminuição destas substâncias de modo que eles atuem no interior celular por curto período de tempo (Uttara et al., 2009). As células têm mecanismos que neutralizam os EROs de modo fisiológico, evitando assim, um desequilíbrio na homeostase celular e, conseqüentemente, a instalação do estresse oxidativo, que é prejudicial e leva a morte celular pelo mecanismo apoptótico (Klein & Ackerman, 2003). Dentre as ERO, têm-se radicais hidroxila (OH), os superóxidos (O_2^-), peroxila (LOO) e alcoxila (LO), e os não radicais como oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre estes compostos EROs, alguns são altamente reativos comprometendo os lipídeos das membranas celulares, as proteínas de transcrição e o DNA celular. Outros podem não ser muito reativos, entretanto dão origem a outros compostos químicos danosos ao metabolismo celular (Barreiros et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma ERO gerada como subproduto da atividade enzimática e o de oxidação que resulta na produção de radicais hidroxila. O H_2O_2 tem importância fisiológica e patológica, pois é altamente difusível e pode atravessar a membrana plasmática (Ferreira & Matsubara, 1997). Pode alterar vários mecanismos celulares, as funções de biomoléculas, inativação de enzima e oxidação de proteínas.

Diferentes estudos utilizam o H_2O_2 para induzir o estresse oxidativo (Park et al, 2015; Niralandevi et al, 2014) no modelo celular SH-SY5Y (Neuroblastoma humano). Estes ensaios buscam elucidar o mecanismo de estresse oxidativo celular que está envolvido com o conceito de envelhecimento e de promoção e diferenciação celular. Os danos infligidos pelo acúmulo de EROs – endógenos ou exógenos – resultam em uma perturbação do equilíbrio oxidante-antioxidante existente nas células, inibindo os mecanismos de defesa que funcionam como antioxidantes (Gille & Joenje, 1992). A exposição da célula SH-SY5Y, *in vitro*, a diferentes concentrações de H_2O_2 permite mimetizar os processos degenerativos de doenças neurais, e assim, buscar melhor compreensão do que ocorre nas células do sistema nervoso central, em condições *in vivo*, quando submetidas a um alto estresse oxidativo.

Diante da grande diversidade de estudos encontrados, dos diferentes protocolos de indução do estresse oxidativo com uso do H_2O_2 , o objetivo do presente estudo é avaliar quais concentrações e em qual intervalo de tempo o peróxido de

hidrogênio é capaz de induzir, experimentalmente, um estresse oxidativo no modelo celular SH-SY5Y, uma vez que é uma molécula instável e volátil quimicamente.

2. Metodologia

A metodologia científica neste estudo é de caráter hipotético dedutivo, qualitativo, quantitativo (Pereira, Shitsuka, Parreira & Shitsuka, 2018). Os resultados obtidos foram comparados pelo teste de ANOVA ONE-WAY e TWO-WAY, sendo confirmados pelo teste Tukey. Para a realização das análises estatísticas e gráficos foi utilizado o *software* GraphPad Prisma 6®. Foram definidos cinco grupos experimentais, sendo: um grupo controle (G1) e quatro grupos experimentais (G2, G3, G4 e G5) com concentrações de 0,2; 0,5; 2,5 e 10 mM H₂O₂ respectivamente. Cada grupo foi avaliado nos tempos de 2, 4 e 6 horas após a exposição ao H₂O₂ (Rossato et al. 2020).

2.1 Cultura celular e plaqueamento

Os experimentos foram realizados com a linhagem celular SH-SY5Y (Neuroblastoma humano ATCC - CRL-2266). O modelo celular deste projeto de pesquisa foi definido com base na literatura, que descreve essa linhagem como sendo o modelo *in vitro* para estudos de doenças degenerativas do sistema nervoso central. O cultivo foi realizado em garrafas de cultura celular com área de crescimento de 25 cm² preenchidas com meio DMEM/F12 (*Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e antimicótico em estufa (*CO2 Incubator – COM-170AICUV – Panasonic Healthcare*) a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂.

Para realizar o plaqueamento celular, foram selecionadas as garrafas que estiveram confluentes, sendo tripsinizadas (tripsina a 0,25% + EDTA a 0,05%) e centrifugadas. O pellet de células foi ressuspenso em 2 mL de meio de cultura, dos quais 10 µL foram colhidos, seguindo-se a quantificação do número de células em câmara de Neubauer para definição da quantidade de células a ser adicionada por poço da placa de cultura experimental. As células foram distribuídas em placas de 24 poços, com área de cultivo celular de 1,93 cm² conforme protocolo de Zabeu et al. (2021). Cada poço foi preenchido com a quantidade mínima de 1x10⁵ células.

2.2 Ensaio de viabilidade celular - Azul de Tripano

A avaliação da viabilidade celular frente à exposição de diferentes concentrações de H₂O₂ foi realizada por meio do ensaio de exclusão de Azul de Tripano. O princípio do ensaio se baseia no fato de que membranas plasmáticas intactas – presentes em células vivas – impedem a internalização do corante. Este método colorimétrico vai corar as células inviáveis que tiveram sua membrana lesionada pela ação do H₂O₂, de forma tal que o azul de tripano se incorporará ao interior da célula. Após a exposição das células frente às diferentes concentrações de H₂O₂ nos tempos de 2, 4 e 6 horas, procedeu-se a retirada do meio de cultura cuidadosamente e foi adicionado 150 µL de azul de tripano a 0,2% por 5 minutos. Em seguida, lavou-se cada poço com solução salina balanceada de Hank's, e por fim adiciona-se mais 150 µl desta solução salina para a realização da contagem no microscópio óptico Leica DMIL e as imagens foram capturadas via câmera de vídeo digital Leica DFC 300FX. (Salles et al., 2017) e as células foram contadas por meio do *software* ImageJ®.

2.3 Ensaio de avaliação da atividade mitocondrial - MTT

O teste de MTT é uma avaliação colorimétrica com o objetivo de avaliar a atividade mitocondrial, que consiste na degradação do sal de MTT, uma solução amarela ([3-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóliobrometo]) em cristais de formazan – uma solução roxa – pelas desidrogenases mitocondriais das células íntegras e viáveis. Assim, a produção de formazan vai refletir o estado funcional da cadeia respiratória mitocondrial e viabilidade celular. Após a exposição das células frente às

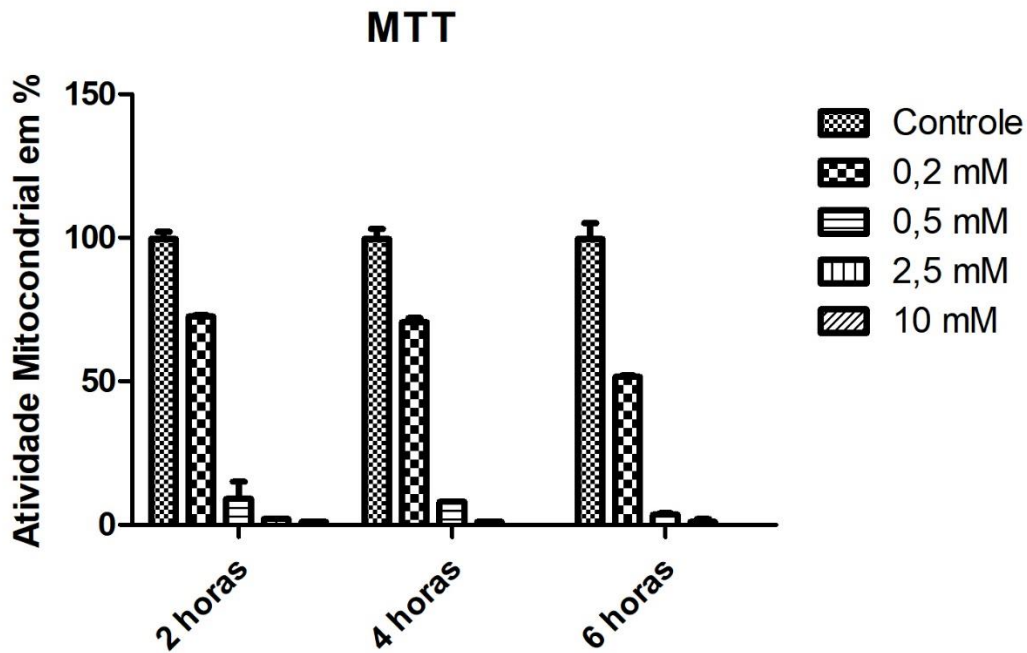
diferentes concentrações de H₂O₂ nos tempos de 2, 4 e 6 horas, procedeu-se à retirada do meio de cultura cuidadosamente e foram adicionados 300 µL de solução de MTT, na concentração de 0,5 mg/mL por poço, e deixado incubando por 3 horas. Ao final deste período de incubação, retirou-se a solução de MTT de cada poço e adicionaram-se 400 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), permanecendo a mistura por 5 minutos em agitação e, em seguida, foi realizada a leitura. A leitura da absorbância dos cristais de formazan de cada amostra foi determinada em um leitor ELISA *Spectracount* (Packard Instrument Company Inc., Meriden, CT, EUA), com filtro de 570 nm. O resultado obtido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Figura 1).

3. Resultados

Na avaliação de viabilidade mitocondrial (Figura 1), a análise estatística dos resultados dos ensaios de MTT realizados com as células SH-SY5Y expostas aos cinco níveis de concentração de H₂O₂ (0,2mM, 0,5mM, 2,5 mM e 10 mM) durante os tempos de exposição de 2, 4 e 6 horas, permite dizer que: houve diferença significativa entre os casos em que as células foram expostas a 0,2mM durante os períodos de 2 e 6h (P<0,0001); houve diferença significativa entre os casos em que as células foram expostas a 0,2mM durante os períodos de 4 e 6h (P<0,0001), não houve diferença significativa entre os casos em que as células não foram expostas a H₂O₂ (grupo controle) durante os períodos de 2, 4 e 6h; não houve diferença significativa entre os comportamentos de células quando expostas às concentrações de 0,5, 2,5 e 10 mM.

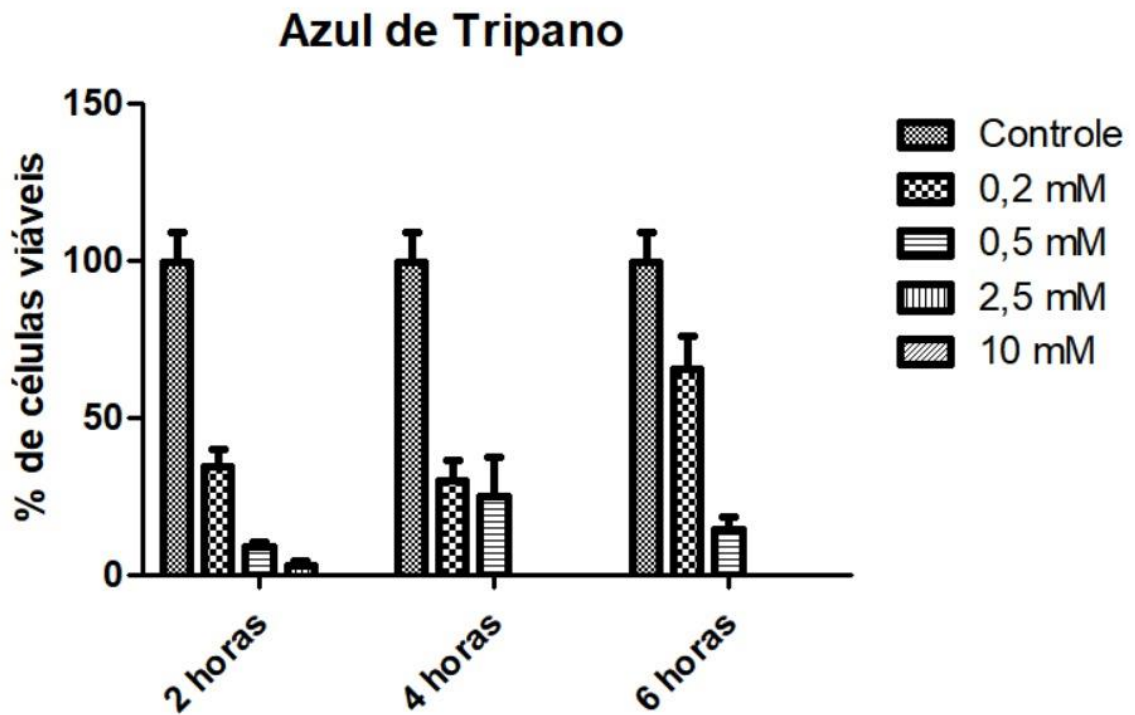
Na avaliação de viabilidade celular (Figura 2), a análise estatística dos resultados dos ensaios de azul de tripano realizados com as células SH-SY5Y expostas aos cinco níveis de concentração de H₂O₂ (0,2mM, 0,5mM, 2,5 mM e 10 mM) durante os tempos de exposição de 2, 4 e 6 horas, permite dizer que: houve diferença significativa entre o grupo controle e os em que as células foram expostas as diferentes concentrações de H₂O₂ (0,2mM, 0,5mM, 2,5 mM e 10 mM) durante os períodos de exposição (P<0,0001); houve diferença significativa entre os casos em que as células foram expostas a 0,2mM quando comparados aos casos em que as células foram expostas as concentrações de 2,5 e 10 mM durante os períodos de 2,4 e 6h (P<0,0001); houve diferença significativa entre os casos em que as células foram expostas a 0,2mM quando comparados ao caso em que as células foram expostas à concentração de 0,5 mM durante os períodos de 2,4 e 6h (P<0,0004); não houve diferença significativa entre os comportamentos de células quando expostas às concentrações de 0,5, 2,5 e 10 mM (onde P > 0.0812). Nos casos em que as células foram expostas às concentrações de 2,5 e 10 mM, em todos os períodos de exposição, ocorreu morte de 100 % da amostra (Figura 2). As imagens obtidas na microscopia óptica (Figura 3) demonstram que com a exposição das células SHSY5Y a concentrações maiores (0,5; 2,5 e 10 mM de H₂O₂) em relação ao tempo, ocorrem maiores danos celulares e até a ocorrência de 100 % de morte das células da amostra, em consonância aos resultados encontrados nos testes de MTT e Azul de tripano (Figura 1 e 2).

Figura 1: Viabilidade de células de neuroblastoma humano expostas a concentrações crescentes de H₂O₂, nos tempos de 2, 4 e 6 horas, avaliada pelo teste de MTT de atividade mitocondrial.



Fonte: GraphPad Prism 6.0.

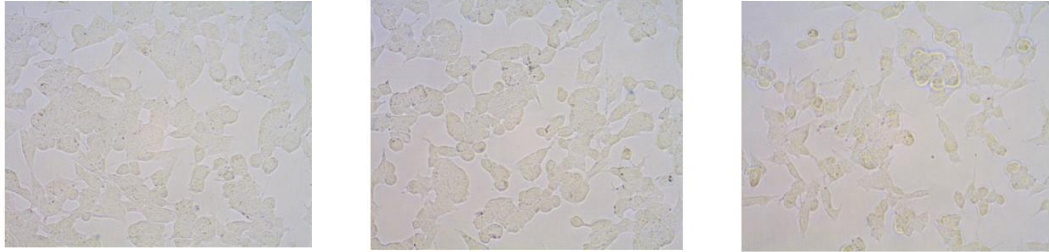
Figura 2: Viabilidade de células de neuroblastoma humano expostas a concentrações crescentes de H₂O₂, nos tempos de 2, 4 e 6 horas, avaliada pelo ensaio azul de tripano.



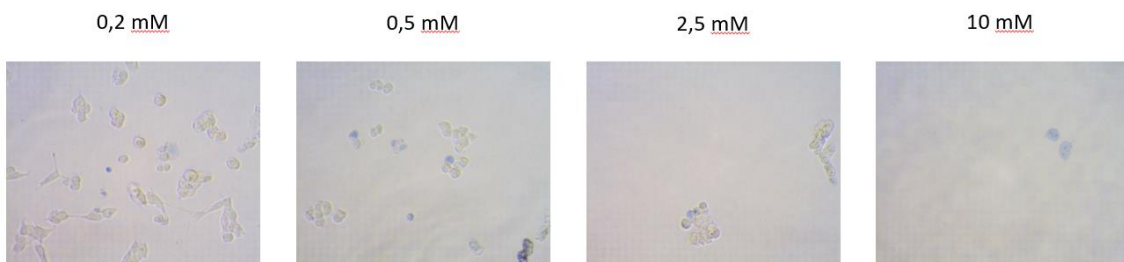
Fonte: GraphPad Prism 6.0.

Figura 3: Células de neuroblastoma humano expostas a concentrações crescentes de H_2O_2 , nos tempos de 2, 4 e 6 horas. Foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando o ensaio azul de tripano, obtendo dados qualitativos.

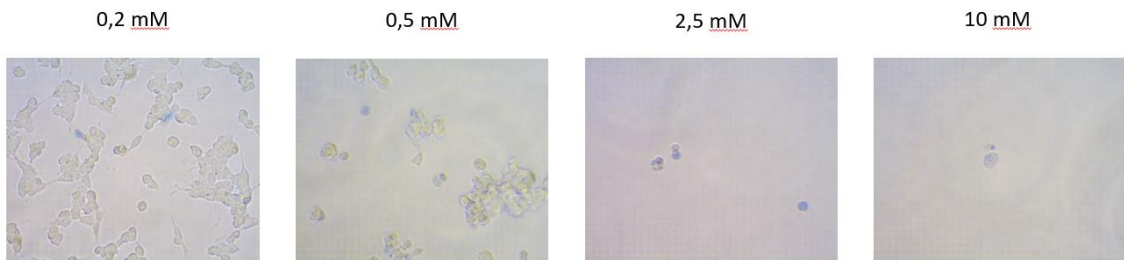
Grupo Controle – sem exposição ao H_2O_2



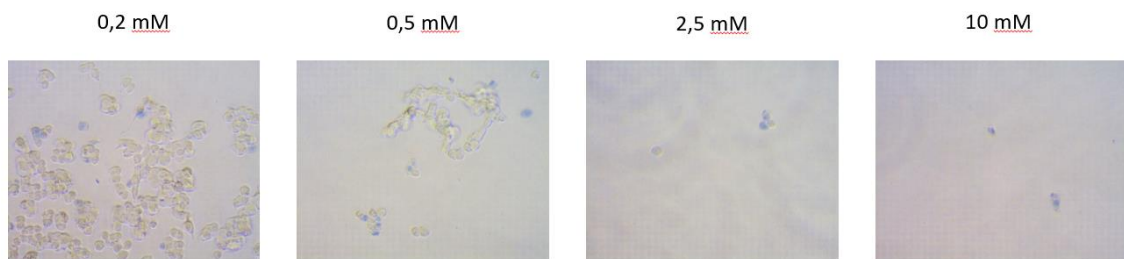
2 horas de exposição ao H_2O_2



4 horas de exposição ao H_2O_2



6 horas de exposição ao H_2O_2



Fonte: Autores.

4. Discussão

O H_2O_2 isoladamente é inócuo e estável quando adicionado diretamente ao meio de cultura simples, contudo na presença de células a concentração de H_2O_2 decai de modo dependente da concentração celular. O H_2O_2 difunde-se com facilidade no citoplasma celular, sendo a catalase a enzima responsável pelo mecanismo de detox, sendo a efetividade desta enzima inversamente proporcional aos danos citotóxicos (Gille & Joenje, 1992). Os efeitos deletérios e citotóxicos provocados

nas células pela exposição ao H_2O_2 tais como a peroxidação lipídica e os danos ao DNA, decorrem da formação de radicais OH^\cdot catalisados pelos metais presentes nas cromatinas (Barreiros et al., 2006).

Nas células normais estima-se que 1% dos elétrons que atuam na atividade mitocondrial levam a formação de superperóxidos sendo este um mecanismo normal e fisiológico, contudo, qualquer interferência no transporte dos elétrons na cadeia mitocondrial pode resultar em um aumento importante da produção de superóxidos. Por ação das enzimas superóxidos dismutases – principal grupo enzimático responsável pela redução dos óxidos e superóxidos do metabolismo celular – há a transformação de O_2 em peróxido de hidrogênio. O H_2O_2 formado reage com metais de transição, via reação de Fenton, originando uma hidroxila (OH^\cdot) muito prejudicial às células (Barreiros et al., 2006).

Outros compostos citotóxicos, tais como o óxido nítrico (NO) e peroxionitrato ($ONOO^\cdot$), formados a partir do peróxido de hidrogênio e dos superóxidos levam à oxidação lipídica e dano as proteínas celulares, sendo estes efeitos altamente deletérios para as células neurais que resultam em morte por apoptose e necrose (Klein & Ackerman, 2003).

O organismo possui sistema de defesa antioxidante com a função de prevenir, inibir e reduzir os danos deletérios dos radicais livres que são constantemente originados a partir do metabolismo celular. Este sistema antioxidante pode, ainda, favorecer e promover os sistemas de reparo celular das estruturas celulares lesadas (Barbosa et al., 2010). Substâncias antioxidantes endógenas, tais como as enzimas Superóxido Dismutases (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), atuam através de mecanismo de prevenção que impedem e controlam a formação de radicais livres e espécies não radicais, e, por conseguinte, evitando a ocorrência de danos oxidativos às células. Sistema de defesa não enzimático, que previnem a formação de radicais livres ou os sequestram, são compostos oriundos das dietas (Barbosa et al., 2010).

Estudos de estresse oxidativo utilizam o peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações para avaliar as manifestações de diversos modelos celulares frente à sua exposição (Nirmaladevi et al., 2014; Park et al., 2015; Bader et al., 2020; Seetapun et al., 2013; Uberti et al., 2002; Ruffels et al., 2003; Tetich et al., 2004). Diante disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar frente à quais concentrações e intervalos de tempo o modelo celular SHSY5Y sofreu estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que, na concentração de 0,2 mM com período de exposição 2 horas, o H_2O_2 foi capaz de promover estresse oxidativo das células SHSY5Y em comparação com o grupo controle não exposto ao peróxido de hidrogênio e sem promover a morte celular em 50 % das células tratadas com esta substância oxidante. Este resultado corrobora o de Seetapun et al. (2013) que avaliou células SHSY5Y frente à exposição de 150 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 por 24 horas e tratada com extrato seco de *Salvia vermelha* por 02 horas e obteve resultado de redução da viabilidade celular de 40 a 50% das células tratadas previamente. Os resultados do presente estudo também vão ao encontro dos resultados encontrados por Nirmaladevi et al. (2014), quando expuseram o mesmo modelo celular SHSY5Y frente a 100 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 por 24 horas e obtiveram estresse oxidativo das células com morte celular maior que 50%, observado em testes de viabilidade celular. Comparando-se os presentes resultados para a exposição das células à concentração de 0,2 mM de H_2O_2 por um período de 02, 04 e 06 horas com os achados de Nirmaladevi et al. (2014) pode-se concluir que os efeitos oxidativos causados nas células pelo peróxido são proporcionais à concentração e ao tempo de exposição. O estudo de Park et al. (2015) também corrobora com esta afirmação: em seu estudo, a exposição de células de neuroblastoma por 30 minutos a uma concentração de 100 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 permitiu observar o aumento de ROS.

O estudo de Ruffels, Griffin & Dickenson (2003), que utilizaram em seu experimento as concentrações de 0,75 e 1,0 mM de H_2O_2 por 16 h, na presença ou não de inibidores farmacológicos das quinases, demonstrou aumento significativo da fosforilação das quinases celulares e, após 10 minutos, as concentrações destas proteínas voltaram aos níveis basais. Mas seus resultados sugerem que estudos mais aprofundados devem ser executados para esclarecer melhor o estresse oxidativo causado pelo peróxido de modo a esclarecer quais mecanismos protetivos das células ele estimula de modo robusto.

Os estudos experimentais de Loh et al. (2002), em que células do miocárdio foram submetidas a altas concentrações de H_2O_2 (0,1 a 3 mM) em períodos que variaram de 30 minutos à uma hora de exposição, indicaram que houve promoção de uma acidose intracelular acentuada, com alteração irreversível do pH intracelular, o que levou a uma alta produção de OH^- (via reação de fenton) causando isquemia do tecido, sendo tempo e dose dependente. Isso foi um achado importante para entender que maneira o estresse oxidativo em células do miocárdio são determinantes para uma boa reperfusão deste tecido pós lesional.

Quando se comparam os resultados de Loh et al. (2002) com os presentes achados *in vitro* das células SHSY5Y, conclui-se que em ambos os estudos houve efeitos devastadores nas células nas concentrações mais altas de H_2O_2 . A concentração de 0,5 mM que foi empregada no presente trabalho nos tempos de 2, 4 e 6 horas demonstrou que o estresse oxidativo promovido na cultura de células de neuroblastoma humano promove a morte celular em porcentagem elevada quando comparado ao grupo controle e ao grupo de 0,2 mM de concentração de H_2O_2 e expressiva diminuição da viabilidade celular (Figura 1 e 2). Nas concentrações de 2,5 e 10 mM utilizadas em todos os tempos de exposição, os resultados demonstraram que houve morte celular e observamos rompimento total das células (Figura 3). Em estudos *in vitro* isso pode confundir e dar resultados não fidedignos. Os nossos resultados quando da comparação entre os grupos 0,5; 2,5 e 10 mM não demonstraram qualquer diferença estatística ($P > 0.0812$), isso se deve ao fato da ocorrência de uma completa dissolução das células, não sendo possível nem mesmo a marcação das mesmas com o azul de tripano (Figuras 2 e 3).

O ensaio de Feng et al. (2016), em que utilizou 400 μM de H_2O_2 por 24 horas em células SHSY5Y, considerou esta dose como letal ao neuroblastoma. Quando comparamos seus resultados com os resultados que obtivemos na comparação do grupo de 0,5 mM de H_2O_2 em todos os tempos de exposição, comprovamos novamente que os efeitos oxidativos do peróxido nas células são tempo e concentração dependentes. Podemos inferir que concentrações altas e curtos períodos de tempo podem promover o estresse oxidativo, ativar os mecanismos protetivos das células e esta então conseguir se recuperar. Em contraponto a isso, altas concentrações por longos períodos de exposição promovem o estresse oxidativo, mas não ativam os mecanismos protetivos celulares de modo eficiente permitindo a recuperação celular. O excesso de H_2O_2 leva ao acúmulo de EROs no intracelular e rompe o ponto de equilíbrio entre as espécies reativas originadas e os mecanismos de defesa danificam moléculas biológicas levando a perda das funções da célula levando ao processo de apoptose e, por conseguinte a necrose (Zhang et al., 2020).

5. Conclusão

É possível observar que a partir da concentração de 0,2 mM no tempo de 2 horas, há uma diminuição significativa no número de células em relação ao grupo controle, sendo assim, com o aumento das demais concentrações em relação ao tempo, ocorre mais danos celulares. A diminuição da viabilidade celular quando a SH-SY5Y é exposta ao peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à concentração e ao tempo de exposição.

Os achados experimentais em corroboração com outros estudos já desenvolvidos mostram que na menor concentração e no menor tempo de exposição (0,2 mM em 2 horas) é possível promover o estresse oxidativo no modelo celular de neuroblastoma humano e assim estabelecer como protocolo de avaliação *in vitro* para diferentes tratamentos e estudos dos mecanismos antioxidantes. Em concentrações superiores, a partir de 0,5 mM as células podem evoluir para morte apoptótica em função do tempo de exposição.

Sugerem-se estudos em períodos de tempo inferior a 120 minutos com o objetivo de verificar a viabilidade celular frente às altas concentrações do peróxido de hidrogênio no menor tempo de exposição possível. Estudos futuros são necessários para estabelecer um protocolo *in vitro* onde haja a ocorrência do estresse oxidativo sem morte celular, configurando maior confiabilidade para comparar os diferentes estudos que utilizam o H_2O_2 na promoção de estresse oxidativo em modelos celulares.

Referências

- Bader, R., Ibrahim, J. N., Moussa, M., Mourad, A., Azoury, J., Azoury, J., & Alaaeddine, N. (2020). In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H₂O₂-induced oxidative stress in human spermatozoa. *Andrology*, 8(1), 191-200.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev Nutr*, 23(4), 629-43.
- Barreiros, A. L., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, 29(1), 113-123.
- Feng, C., Luo, T., Zhang, S., Liu, K., Zhang, Y., Luo, Y., & Ge, P. (2016). Lycopene protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against hydrogen peroxide-induced death via inhibition of oxidative stress and mitochondria-associated apoptotic pathways. *Molecular medicine reports*, 13(5), 4205-4214.
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira*, 43(1), 61-68.
- Gille, J. J. P., & Joenje, H. (1992). Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 405-414.
- Klein, J. A., & Ackerman, S. L. (2003). Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*, 111(6), 785-793.
- Loh, S. H., Tsai, C. S., Tsai, Y., Chen, W. H., Hong, G. J., Wei, J., & Lin, C. I. (2002). Hydrogen peroxide-induced intracellular acidosis and electromechanical inhibition in the diseased human ventricular myocardium. *European journal of pharmacology*, 443(1-3), 169-177.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Chandranayaka, S., Ramesha, A., Jameel, N. M., & Srinivas, C. (2014). Neuroprotective effects of bikaverin on H₂O₂-induced oxidative stress mediated neuronal damage in SH-SY5Y cell line. *Cellular and molecular neurobiology*, 34(7), 973-985.
- Park, H. R., Lee, H., Park, H., Jeon, J. W., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2015). Neuroprotective effects of Liriope platyphylla extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-11.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. UFSM.
- Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125-1131.
- Rossato, R. C., Pinto, J. C., de Oliveira Moraes, C. D. G., de Oliveira Moraes, J. T. G., Salles, G. N., & Soares, C. P. (2020). Efeitos neuroprotetores da hidroclotisona em linhagem de Neuroblastoma de Murino (NEURO-2A) sob estresse oxidativo. *Revista Univap*, 26(52), 93-106.
- Ruffels, J., Griffin, M., & Dickenson, J. M. (2004). Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *European journal of pharmacology*, 483(2-3), 163-173.
- Salles, G. N., Pereira, F. A. D. S., Pacheco-Soares, C., Marciano, F. R., Hölscher, C., Webster, T. J., & Lobo, A. O. (2017). A novel bioresorbable device as a controlled release system for protecting cells from oxidative stress from Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*, 54(9), 6827-6838.
- Seetapun, S., Yaoling, J., Wang, Y., & Zhu, Y. Z. (2013). Neuroprotective effect of Danshensu derivatives as anti-ischaemia agents on SH-SY5Y cells and rat brain. *Bioscience Reports*, 33(4).
- Tetich, M., Kutner, A., Leskiewicz, M., Budziszewska, B., & Lason, W. (2004). Neuroprotective effects of (24R)-1, 24-dihydroxycholecalciferol in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 89, 365-370.
- Uberti, D., Piccioni, L., Colzi, A., Bravi, D., Canonico, P. L., & Memo, M. (2002). Pergolide protects SH-SY5Y cells against neurodegeneration induced by H₂O₂. *European journal of pharmacology*, 434(1-2), 17-20.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- van Muiswinkel, F. L., & Kuiperij, H. B. (2005). The Nrf2-ARE Signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 4(3), 267-281.
- Zabeu, A. M. C., Carvalho, I. C. S., Pacheco-Soares, C., & da Silva, N. S. (2021). Biomodulatory effect of low intensity laser (830 nm.) in neural model 9L/lacZ. *Research, Society and Development*, 10(8), e11310817025-e11310817025.
- Zhang, X., Wang, L., Lu, H., Zong, Z., Chen, Z., Li, Y., & Li, Y. (2020). Preservation of hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HepG-2 cells by rice protein hydrolysates pretreated with electron beams. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.