Modelagem tridimensional *in vitro* da Doença de Alzheimer: Avaliação do potencial neuroprotetor da taurina na preservação mitocondrial e nuclear de células SH-SY5Y

Milena Yuki Rosental Sudo, Geisa Rodrigues Salles, Erick José Nogueira de Andrade, Cristina Pacheco Soares

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

Resumo

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa associada ao estresse oxidativo e à perda neuronal, sendo essencial investigar potenciais neuroprotetores em modelos 3D. Este trabalho avaliou a ação da taurina na preservação das mitocôndrias e do núcleo em esferoides de células SH-SY5Y submetidos ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O tratamento com taurina promoveu a reorganização estrutural dos esferoides com aumento de sua área e manutenção da viabilidade celular. Diante do H_2O_2, a taurina exerceu efeito citoprotetor, preservando a matriz tridimensional e reduzindo o sinal mitocondrial como resposta adaptativa. Conclui-se que o modelo 3D é eficaz e que a taurina atua como um agente neuroprotetor promissor.

Palavras-chave: Esferoides. Doença neurodegenerativa. Taurina. Estresse Oxidativo.

Área do Conhecimento: Biomedicina

Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é um dos tipos mais comuns de demência, sendo uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda maciça de sinapses e morte neuronal na região cerebral responsável pelas funções cognitivas, o que resulta em perda progressiva de memória, deficiência de linguagem e de funções visuoespaciais (Sereniki; Vital, 2008). O aumento progressivo da DA com o envelhecimento torna a idade o principal fator de risco para essa doença, que dobra a prevalência a partir dos 65 anos (Aprahamian; Martinelli; Yassuda, 2008).

A linhagem celular SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano, é um dos modelos mais utilizados na investigação de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, devido à sua capacidade de proporcionar interações moleculares e fisiopatológicas, de avaliar a atuação de fármacos e de apresentar diferentes respostas a estímulos neurais (Teixeira, 2018; Pinheiro *et al.*, 2025). Além disso, essa linhagem celular tem a capacidade de se diferenciar em fenótipo neuronal, adquirindo morfologias funcionais de neurônios humanos, o que reduz sua proliferação e aumenta seu potencial de neurotoxicidade e de neuroproteção na pesquisa experimental (Xie; Hu; LI, 2010). Contudo, os modelos bidimensionais tradicionais apresentam limitações para simular a complexidade tecidual do cérebro em condições degenerativas (Kapatczynka *et al.*, 2018).

Para superar essa limitação, a cultura celular pode ser realizada em modelos tridimensionais (3D), que proporcionam maior proximidade entre o microambiente fisiológico e as células, possibilitando a mimetização da estrutura e da função de órgãos (Ojeda, 2021). Essa organização promove o estudo das interações celulares, das sinapses, dos processos de neuroinflamação e das respostas a possíveis tratamentos em condições patológicas, como na DA (Abuwatfa; Pitt; Husseini, 2024).

Nesse contexto patológico, um dos principais mecanismos associados ao dano neuronal é o estresse oxidativo. Ele ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), subprodutos gerados naturalmente pelo metabolismo celular ou por fatores externos, e a capacidade dos mecanismos de defesa da célula de neutralizá-las. Esse excesso de compostos altamente reativos, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, danifica estruturas vitais, como lipídeos, proteínas e DNA, podendo inibir os defensores antioxidantes e levar à morte celular e a doenças neurodegenerativas, o que reforça a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas eficazes capazes de atuar em modelos tridimensionais de neurodegeneração, como o uso da Taurina (Zabeu *et al.*, 2022).

A taurina é um aminoácido não essencial que desempenha importantes funções de regulação do volume cerebral, de manutenção da integridade da membrana neuronal e de homeostase do cálcio (Tognoni *et al.,* 2026). Além disso, apresenta propriedades neuroprotetoras, sendo capaz de prevenir a morte celular neuronal ao reduzir o estresse oxidativo, relacionado à formação de espécies reativas de oxigênio. Embora as espécies reativas de oxigênio sejam fisiologicamente produzidas pelo próprio metabolismo, sua produção em excesso pode causar danos às células neuronais, além de serem instáveis e reativas, o que possibilita a alteração de outras biomoléculas, como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, contribuindo para o avanço da neurodegeneração (Rossato *et al*., 2021; Bilski *et al*.,2025; Perluigi; Domenico; Butterfield, 2024).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ação da taurina como neuroprotetora nas células SH-SY5Y diferenciadas para o fenótipo neuronal e expostas ao estresse oxidativo, o que proporciona um ambiente similar ao encontrado na Doença de Alzheimer, e, assim, analisar sua atividade mitocondrial e nuclear.

Metodologia

Cultivo da linhagem SH-SY5Y

O cultivo da linhagem celular SH-SY5Y (neuroblastoma humano) foi realizado em meio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina, incubado a 37 °C em estufa com 5% de CO_2, com trocas de meio de cultura a cada dois dias.

Preparação dos moldes de agarose para cultura 3D

A confecção dos moldes tridimensionais foi realizada com agarose a 2% (m/v), dissolvida em salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Em placa de 12 poços, foram adicionados 2 mL da solução de agarose e, posteriormente, inseriram-se os carimbos para a obtenção de cavidades destinadas à formação de esferoides. A solidificação da agarose ocorreu à temperatura ambiente. Após a solidificação, os carimbos foram retirados e as cavidades foram preenchidas com PBS até o momento da semeadura das células.

Plaqueamento e diferenciação neuronal

Após atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/mL e cultivadas por 5 dias em meio completo. Após esse período, as células foram submetidas à diferenciação neuronal, em meio completo contendo 1,4 µL de ácido retinoico, 0,5% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina, diluído em DMEM/F12.

Tratamento com taurina e H_2O_2

Após o período de diferenciação, o meio foi substituído por solução de taurina (Sigma) a 3,0 mg/mL no meio de cultura. Os esferoides foram incubados por 48 h a 37 °C, sob 5% de CO_2. Após esse tempo, o meio foi novamente substituído pelo meio de diferenciação, contendo 200 µM de H_2O_2, por 1 h, e incubado sob as mesmas condições.

Imunofluorescência

A análise da integridade mitocondrial e nuclear nas condições da DA foi realizada com a marcação da sonda MitoTracker™ Orange CMTMRos (1 µM), diluída em meio de diferenciação, incubada a 37 °C e 5% de CO_2 por 30 min após o período de incubação, foi removido o excesso de Mitotracker não internalizado pela agarose. A seguir, as mesmas células foram marcadas com Hoechst, um marcador de DNA, sob as mesmas condições, por 10 min. Após esse período, as células foram lavadas 4 vezes com PBS e analisadas em microscópio confocal (Zeiss Axiovert 100M, Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), localizado no Laboratório de Central Multiusuários do Instituto de Pesquisa e

Desenvolvimento. As imagens foram obtidas com os mesmos parâmetros do microscópio em todos os grupos experimentais.

Resultados

A análise por microscopia confocal de células permitiu avaliar a integridade estrutural dos esferoides, a integridade nuclear e o potencial de atividade mitocondrial viva em resposta aos diferentes tratamentos. O Grupo Controle (coluna A) apresentou esferoides com morfologia esférica tridimensional e coesa, indicando a adequada manutenção da matriz. O núcleo apresentou formato arredondado, contornos bem definidos e sinal cromático uniforme (Figura 1A). A marcação mitocondrial viva revelou uma distribuição homogênea do sinal em todo o corpo do esferoide, indicando a preservação da atividade metabólica (Figura 2A). A imagem de sobreposição (Figura 3A) confirma a localização precisa dos compartimentos celulares e a preservação da organização celular.

No Grupo Taurina (coluna B), quando comparado ao Grupo Controle, observou-se alteração evidente na organização e nas dimensões do esferoide. A análise morfométrica demonstrou aumento da área projetada, de 1.125,99 ± 484,94 μm² no controle para 1.796,30 ± 80,74 μm² após o tratamento com taurina (Figura E), o que corresponde a um aumento de aproximadamente 59,5%. A marcação nuclear com Hoechst revelou numerosos núcleos distribuídos ao longo do esferoide, permitindo visualizar a organização celular no modelo tridimensional. Entretanto, na ausência de uma quantificação específica da intensidade de Hoechst, diferenças na intensidade nuclear devem ser interpretadas apenas de forma descritiva.

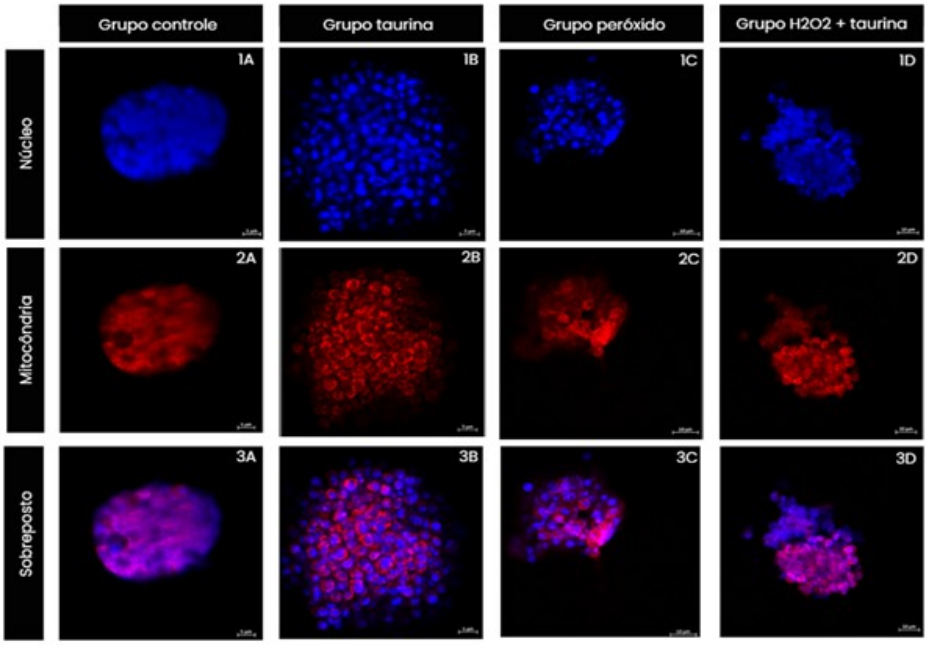
A avaliação mitocondrial revelou aumento da intensidade de fluorescência do MitoTracker Orange no grupo Taurina (85,82 ± 24,54 a.u.) em relação ao Controle (59,68 ± 19,80 a.u.), o que corresponde a um aumento de aproximadamente 43,8%, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística no pós-teste de Tukey. O maior sinal de MitoTracker, associado ao aumento da área do esferoide, indica modulação da organização (Figura 1F) e do estado mitocondrial promovida pela taurina. A análise de CytoViability após 48 h mostrou valores próximos aos do controle (94,8%), o que não indica comprometimento da viabilidade celular. Em conjunto, as imagens sobrepostas dos canais nuclear e mitocondrial são compatíveis com a manutenção da organização tridimensional dos esferoides na presença de taurina.

Em relação ao Grupo H_2O_2 (coluna C), observaram-se alterações na organização morfológica do esferoide em comparação com o Controle. A área média foi de 1.097,31 ± 249,99 μm², valor muito próximo ao observado no grupo controle, indicando que, nas condições experimentais empregadas, o estresse oxidativo não provocou redução global significativa das dimensões do esferoide.

No Grupo H_2O_2 + Taurina (coluna D), os esferoides foram inicialmente pré-tratados com taurina e, posteriormente, submetidos ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2, com o objetivo de avaliar o possível efeito protetor da taurina. A análise morfométrica revelou área média de 2.060,01 ± 133,25 μm², o que corresponde a aproximadamente 183% do controle e representa um aumento expressivo em relação ao grupo submetido somente ao H_2O_2 (1.097,31 ± 249,99 μm²). Esse comportamento sugere que o pré-tratamento com taurina favoreceu a manutenção e/ou a expansão da organização tridimensional dos esferoides, mesmo após o desafio oxidativo.

A análise do canal mitocondrial, entretanto, revelou um comportamento distinto. A intensidade média de fluorescência corrigida do MitoTracker Orange foi de 22,39 ± 7,12 a.u., significativamente inferior aos valores observados no Controle (59,68 ± 19,80 a.u.), H_2O_2 (74,10 ± 10,91 a.u.) e Taurina (85,82 ± 24,54 a.u.). Em relação ao H_2O_2 isolado, o pré-tratamento com taurina resultou em uma redução de aproximadamente 69,8% no sinal do MitoTracker Orange. Considerando que os parâmetros de aquisição foram mantidos constantes entre os grupos, essa diferença indica uma alteração significativa do estado mitocondrial após o pré-tratamento com taurina. Entretanto, a redução da fluorescência não deve ser interpretada isoladamente como perda de função mitocondrial, uma vez que a acumulação do MitoTracker Orange pode ser influenciada pelo potencial de membrana, pela massa, pela distribuição e pelo estado redox mitocondrial.

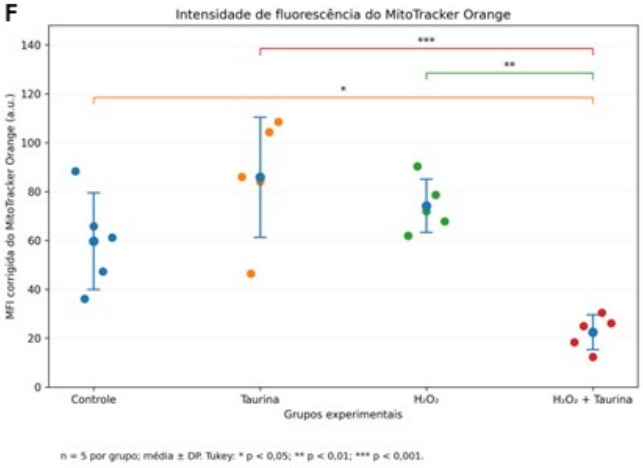
Figura 1 – Análise por microscopia confocal de esferoides de células SH-SY5Y diferenciadas em um modelo neuronal. Imagens representativas dos grupos Controle (A), Taurina (B), H_2O_2 (C) e H_2O_2 + Taurina (D), submetidos à marcação dos núcleos celulares com Hoechst (azul) e das mitocôndrias com MitoTracker (vermelho). Barra de escala = 10 µm.



E

Grupo	Área
Controle	100%
H_2O_2	97,5%
Taurina	159,5%
H_2O_2 + Taurina	183,0%

F



Fonte: Os autores, 2026

Discussão

A análise por microscopia confocal demonstrou que a taurina promoveu alterações na organização tridimensional dos esferoides e no padrão de marcação mitocondrial, sem evidência de comprometimento da viabilidade celular. O Grupo Controle apresentou morfologia esférica e coesa, com distribuição uniforme dos núcleos e do sinal mitocondrial, confirmando a adequada organização do modelo tridimensional.

No Grupo Taurina, o aumento de aproximadamente 59,5% na área projetada, associado à manutenção da viabilidade celular, sugere uma modulação da organização estrutural dos esferoides. Entretanto, esse aumento não deve ser interpretado diretamente como maior proliferação ou massa celular, uma vez que alterações na compactação e no rearranjo celular também podem modificar a área projetada. A taurina está relacionada à regulação do volume celular, à estabilidade de membranas

e à homeostase mitocondrial, o que pode contribuir para as alterações morfológicas observadas (Lambert et al., 2015; Jong et al., 2021).

Embora o grupo Taurina tenha apresentado um aumento de aproximadamente 43,8% na intensidade do MitoTracker Orange em relação ao controle, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Dessa forma, o resultado sugere uma possível modulação do compartimento mitocondrial, mas não permite afirmar aumento da atividade mitocondrial. A taurina desempenha funções associadas à manutenção da homeostase mitocondrial e ao controle do equilíbrio redox, podendo contribuir para a proteção celular sob condições de estresse (Jong et al., 2021; Rossato et al., 2025).

O grupo H_2O_2 apresentou área projetada semelhante à do controle, indicando que, nas condições empregadas, o estresse oxidativo não promoveu redução global das dimensões dos esferoides. Esse resultado demonstra que alterações decorrentes do H_2O_2 podem ocorrer em níveis metabólicos e subcelulares sem necessariamente resultar em alterações morfométricas evidentes.

No grupo H_2O_2 + Taurina, observou-se aumento expressivo da área projetada, aproximadamente 83% superior ao controle e 87,7% em relação ao grupo H_2O_2. Esse resultado sugere que o pré-tratamento com taurina favoreceu a manutenção ou reorganização da estrutura tridimensional dos esferoides diante do desafio oxidativo. Estudos demonstram efeitos citoprotetores da taurina em modelos submetidos ao H_2O_2, associados à redução do estresse oxidativo e à modulação de mecanismos celulares relacionados à sobrevivência (Pan et al., 2010; Han et al., 2016).

Por outro lado, o grupo H_2O_2 + Taurina apresentou redução significativa na intensidade do MitoTracker Orange em comparação com os demais grupos. Esse resultado deve ser interpretado com cautela, pois a intensidade do MitoTracker Orange é influenciada por fatores como o potencial de membrana, o estado redox, a massa e a distribuição mitocondrial. Portanto, a redução do sinal, isoladamente, não permite concluir pela perda de função mitocondrial. Estudos metodológicos destacam, justamente, a necessidade de cautela no uso de sondas MitoTracker para inferir diretamente sobre a função mitocondrial (Neikirk et al., 2023).

Em conjunto, os resultados sugerem que a taurina modulou a organização estrutural dos esferoides e apresentou um possível efeito citoprotetor frente ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2. A dissociação entre o aumento da área dos esferoides e a redução do sinal mitocondrial no grupo H_2O_2 + Taurina indica que as alterações estruturais e mitocondriais podem envolver mecanismos distintos. Estudos complementares envolvendo potencial de membrana, produção de ROS, ATP e bioenergética mitocondrial são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nessa resposta.

Conclusão

O modelo tridimensional com células SH-SY5Y mostrou-se uma ferramenta eficaz para mimetizar a complexidade do microambiente neural em estudos sobre a Doença de Alzheimer. A taurina desempenhou um papel relevante na modulação da organização tecidual, promovendo o aumento da área dos esferoides sem comprometer a viabilidade celular. Frente ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2, o pré-tratamento com este aminoácido exerceu um efeito citoprotetor estrutural, preservando a coesão e a integridade morfológica da matriz 3D. A redução observada na atividade mitocondrial sugere uma adaptação metabólica ou um mecanismo de desacoplamento protetor para mitigar danos oxidativos, e não uma falha funcional. Assim, a taurina se mostra um agente promissor na neuroproteção, sendo fundamentais novos estudos bioenergéticos para detalhar as vias de sinalização envolvidas nessa resposta adaptativa.

Referências

TFA, Waad H.; PITT, William G.; HUSSEINI, Ghaleb A. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. Journal of Biomedical Science, v. 31, n. 1, p. 7, 2024.

APRAHAMIAN, Ivan; MARTINELLI, José Eduardo; SANCHES, Mônica. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico* Alzheimer's disease: an epidemiology and diagnosis review. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/upload/S/1679-1010/2009/v7n1/a27-35.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2026.

BILSKI, Rafał. Perspectives on Alzheimer's Disease Treatment Based on Counteracting Oxidative Stress. Biomolecules, v. 15, n. 9. [S.l.: S.n.].

HAN, Zhou *et al.* Neuroprotection of taurine against reactive oxygen species is associated with inhibiting NADPH oxidases. European Journal of Pharmacology, v. 777, p. 129–135, 2016.

JONG, Chian Ju; SANDAL, Priyanka; SCHAFFER, Stephen W. The role of taurine in mitochondria health: More than just an antioxidant. Molecules (Basel, Switzerland), v. 26, n. 16, p. 4913, 2021.

KAPAŁCZYŃSKA, Marta *et al*. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. Archives of Medical Science, v. 14, n. 4, p. 910–919, 2018.

LAMBERT, I. H. *et al.* Physiological role of taurine--from organism to organelle. Acta physiologica (Oxford, England), v. 213, n. 1, p. 191–212, 2015.

NEIKIRK, Kit *et al.* MitoTracker: A useful tool in need of better alternatives. European Journal of Cell Biology, v. 102, n. 4, p. 151371, 2023.

OJEDA, Mariah. Compostos citotóxicos da biodiversidade brasileira combinados à doxorrubicina no tratamento de câncer de mama em modelos de cultura celular 2D e 3D. Disponível em: <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/3855>. Acesso em: 31 ago. 2026.

PAN, Chunliu *et al.* Taurine protection of PC12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. Journal of Biomedical Science, v. 17 Suppl 1, p. S17, 2010.

PERLUIGI, Marzia; DI DOMENICO, Fabio; BUTTERFIELD, D. Allan. Oxidative damage in neurodegeneration: roles in the pathogenesis and progression of Alzheimer disease. Physiological Reviews, v. 104, n. 1, p. 103–197, 2024.

PINHEIRO, Nathalia *et al.* The human neuroblastoma SH-SY5Y cell line as a model to assess β-amyloid neurotoxicity: A systematic review and meta-analysis. 2025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/2025.10.20.683497>.

ROSSATO, Rafaella Carvalho *et al.* Neuroprotective effects of taurine on SH-SY5Y cells under hydrocortisone induced stress. Research, Society and Development, v. 10, n. 9, p. e55510918426, 2021.

ROSSATO, Rafaella Carvalho *et al*. Photobiomodulation by LED 660 nm and Taurine against H2O2 oxidative stress in SH-SY5Y cells. Lasers in Medical Science, v. 40, n. 1, p. 211, 2025.

SERENIKI, Adriana; VITAL, Maria Aparecida Barbato Frazão. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul, v. 30, n. 1 suppl, 2008.

TEIXEIRA, Alexsander Alves. O Papel do Flavonoide Apigenina em um modelo in vitro da Doença de Parkinson na linhagem celular SH-SY5Y. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/233807>. Acesso em: 31 ago. 2026.

TOGNONI, Christina M. *et al*. Protection of multiple aspects of Alzheimer's disease pathology using dietary supplementation with taurine. Scientific Reports, v. 16, n. 1, p. 2919, 2026.

XIE, Hong-Rong; HU, Lin-Sen; LI, Guo-yi. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease**.** Disponível em: <https://mednexus.org/doi/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021>. Acesso em: 31 ago. 2026.

ZABEU, Caldeira *et al.* Estresse oxidativo em células SH-SY5Y diante da exposição ao peróxido de hidrogênio. Research, Society and Development, v. 11, n. 3, p. e30811326474–e30811326474, 2020.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Universal - Código de Financiamento 404952/2025.