

Valeska Aguiar de Oliveira, Fernanda Martins Lopes, Carolina Beatriz Müller, Giovana Ferreira Londero, Matheus Becker, Liana Marengo, Mario Luiz Conte da Frota Jr, Daniel Pens Gelain, José Cláudio Fonseca Moreira, Fábio Klamt.

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa, crônica e progressiva, caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, culminando na deficiência da função motora. A disfunção mitocondrial e estresse oxidativo estão fortemente relacionados com a fisiopatologia da DP. A cofilina é uma proteína citosólica que atua na morte celular, sendo que ela transloca para a fração mitocondrial após a indução da apoptose por oxidantes, levando a disfunção da organela. Dessa forma, o objetivo deste estudo é caracterizar o papel da cofilina na neurotoxicidade à 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

## Materiais e Métodos

A linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foi cultivada em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e a diferenciação foi induzida em meio de cultivo 1% de SFB e 10 µM de ácido retinóico durante 7 dias.

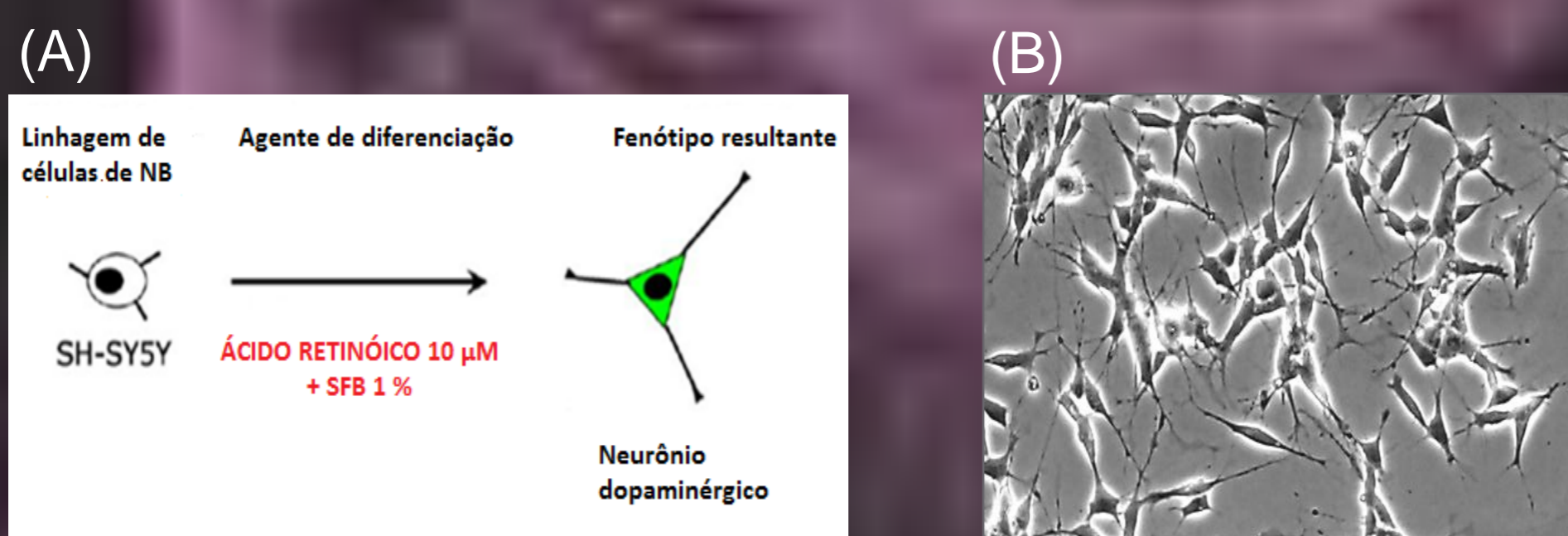
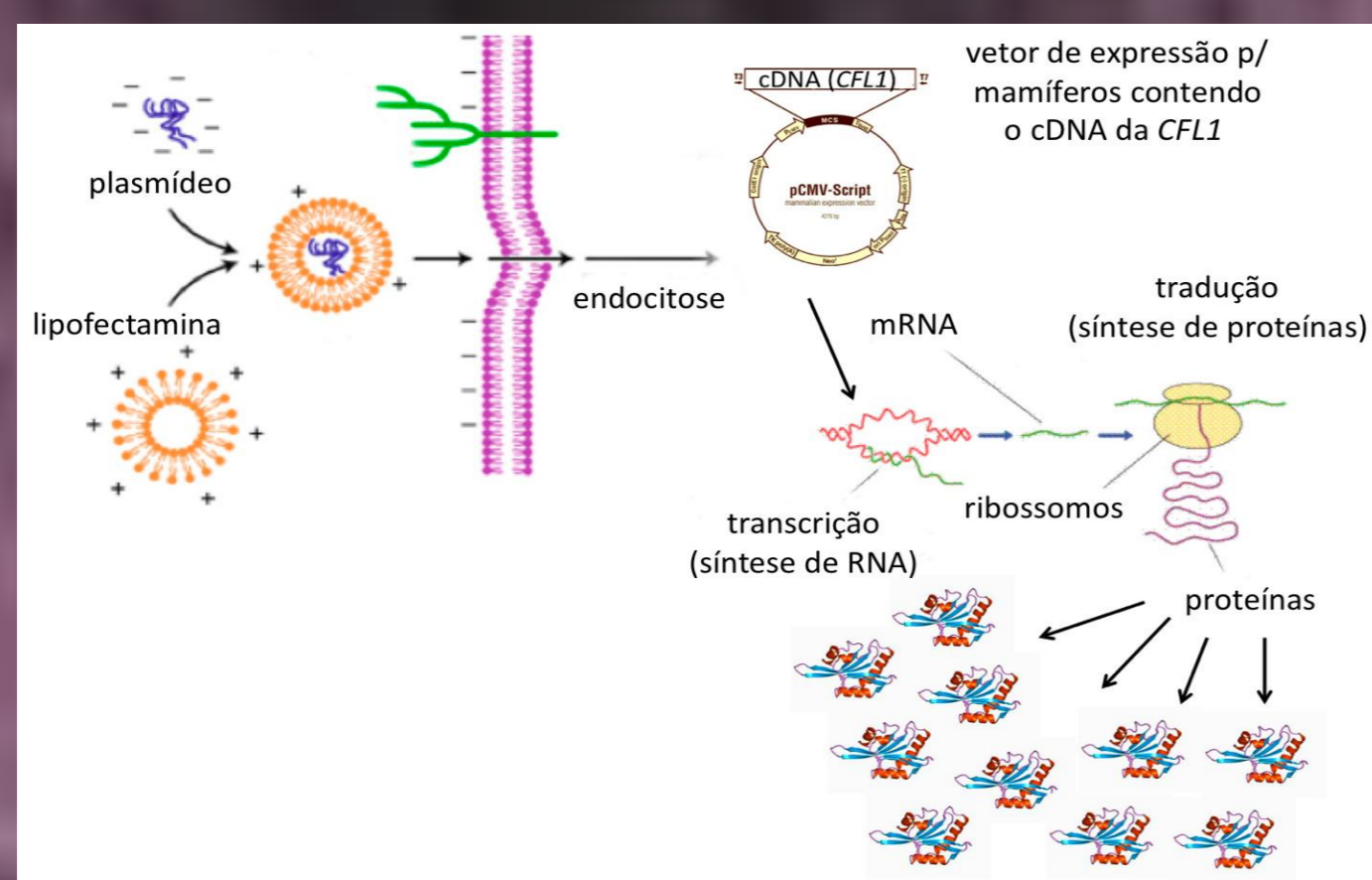


Figura 1: Diferenciação do neuroblastoma humano SH-SY5Y induzida por ácido retinóico (A). Imagem representativa de contraste de fase de células diferenciadas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Resultados retirados de Lopes *et al.*, 2010 (B).

A disfunção mitocondrial causada pela 6-OHDA foi determinada pela perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), usando a sonda JC-1. Após iniciada a despolarização, as mitocôndrias foram isoladas, e a translocação da proteína cofilina para a mitocôndria foi verificada por *dot blot*. Para confirmar o papel da cofilina, as células SH-SY5Y foram transfectadas com cDNA da cofilina.



## Resultados

### Despolarização mitocondrial

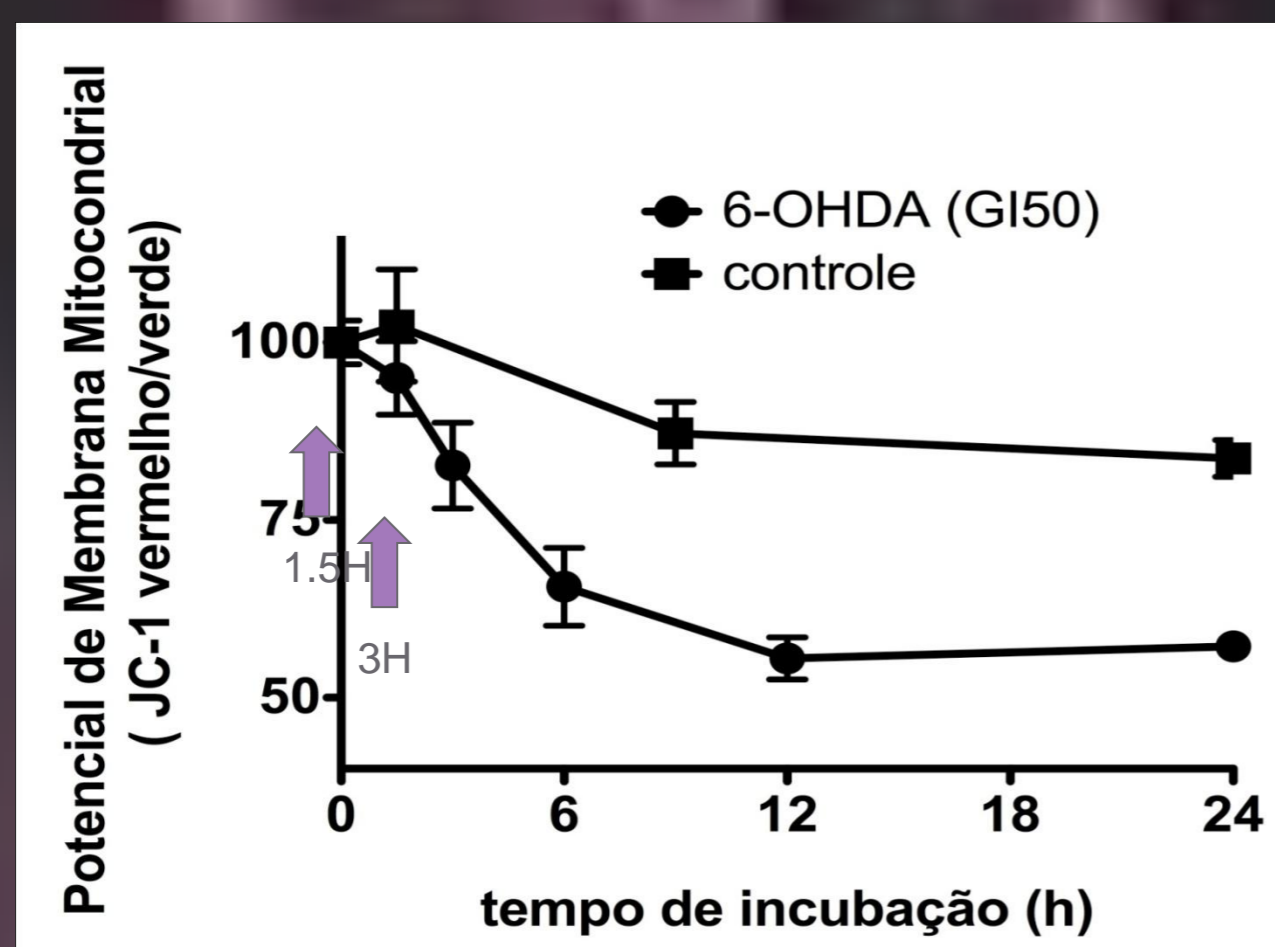


Figura 2: Perda do potencial de membrana mitocondrial em células diferenciadas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os dados foram representados em médias  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicada. Estatisticamente diferente dos valores do controle,  $p < 0,001$  (ANOVA).

## Dot blot

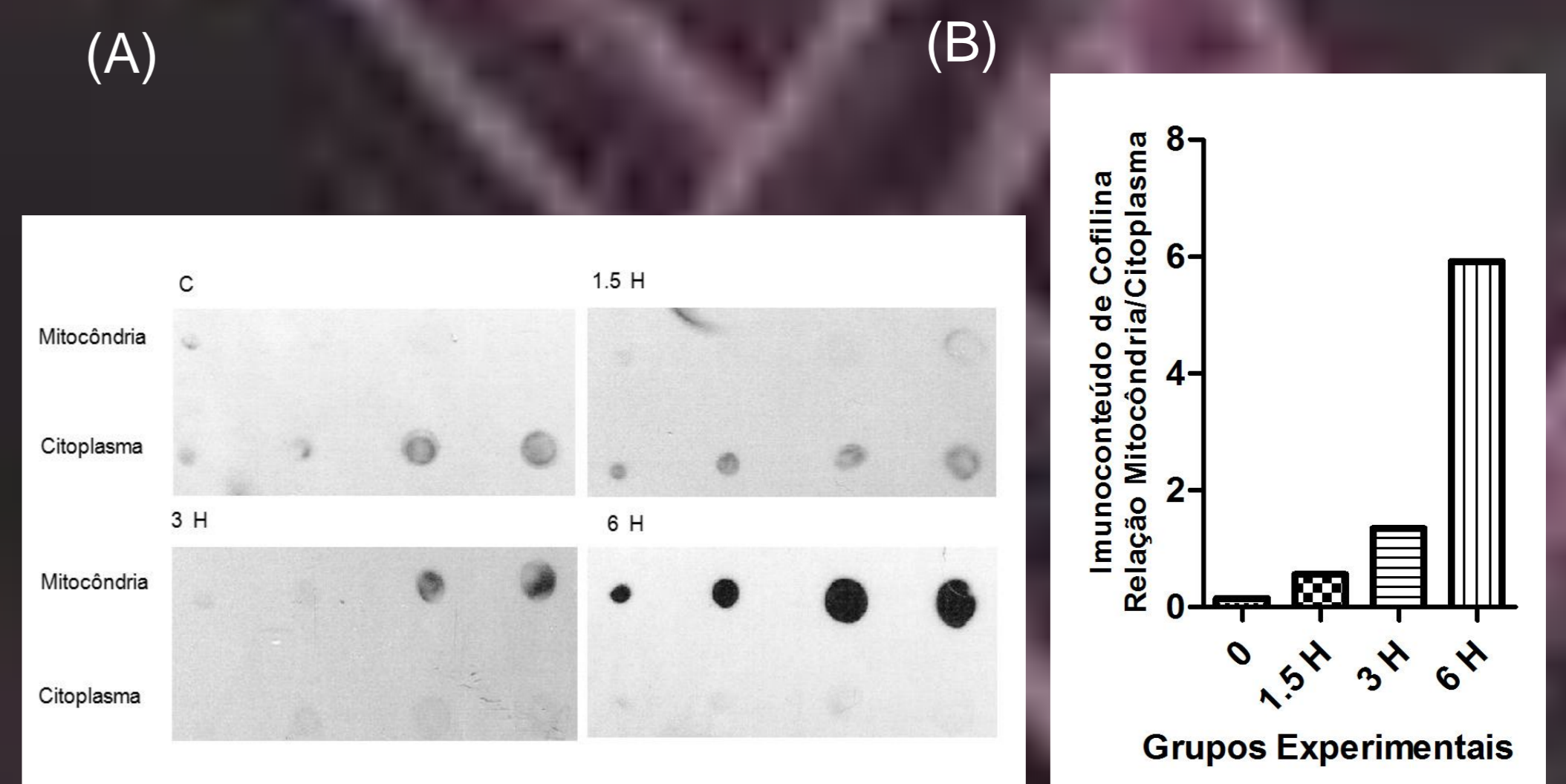


Figura 3: Dot Blot de cofilina nas frações mitocondriais e citoplasmáticas das células diferenciadas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas ou não com 6-OHDA (A). Densitometria dos *immunoblottings* (B).

## Transfecção

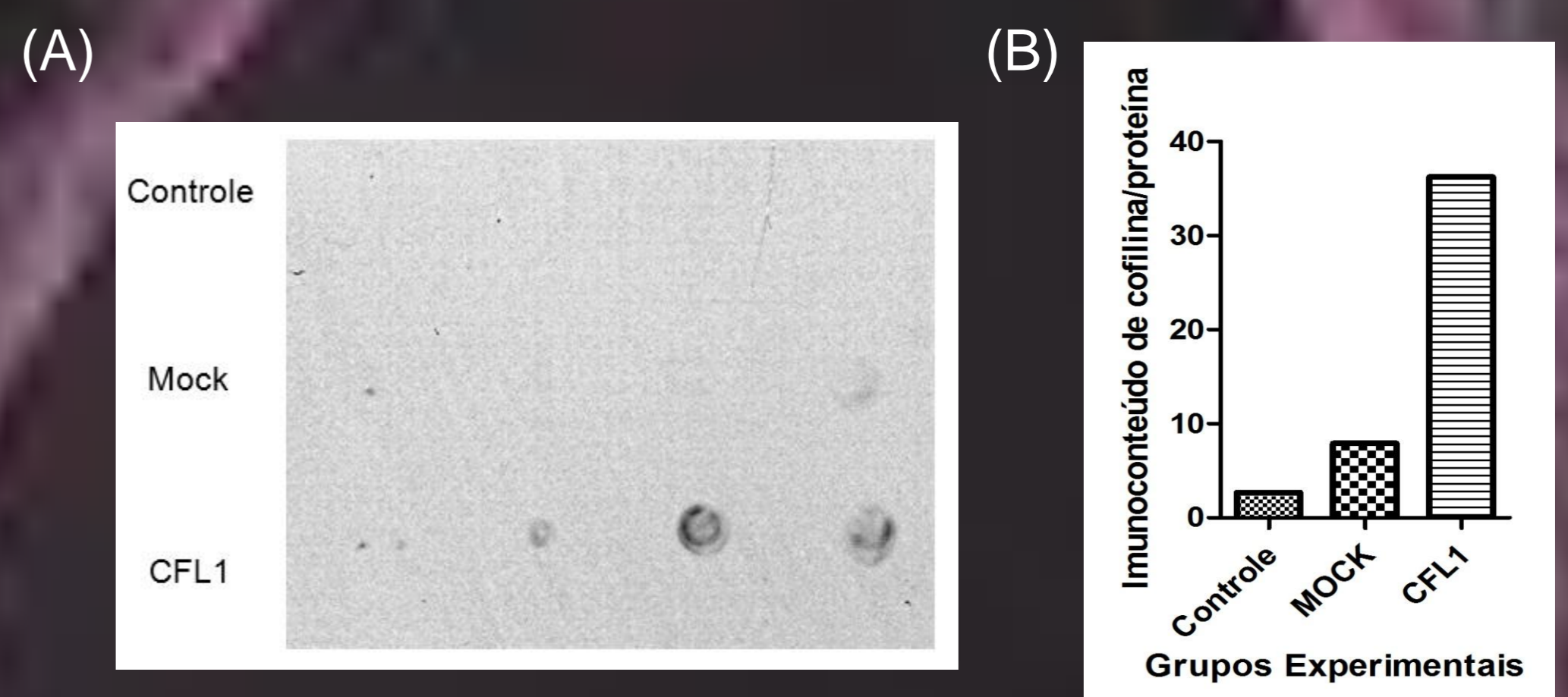


Figura 4: Dot Blot de cofilina em células proliferativas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y transfectadas com a proteína cofilina (A). Densitometria do *immunoblotting* (B).

## Viabilidade

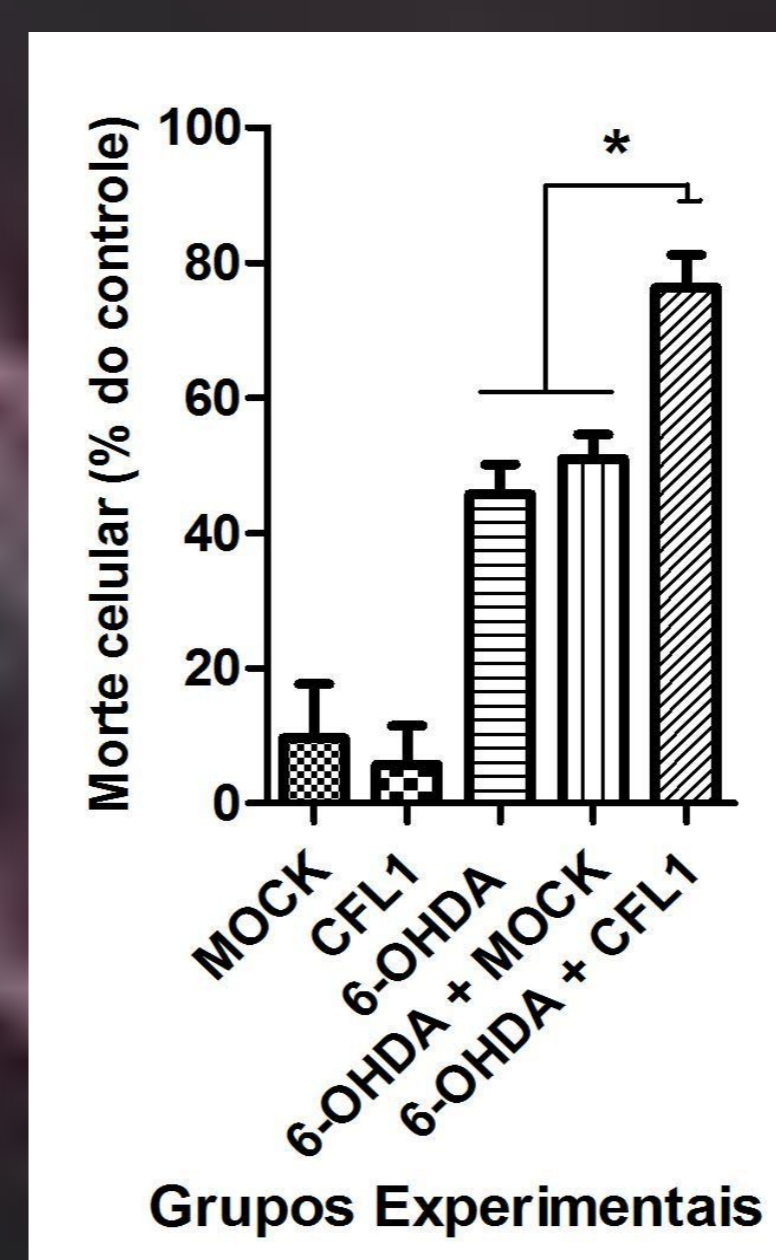


Figura 5: Viabilidade celular após a transfecção da proteína cofilina em células proliferativas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com 6-OHDA. Os dados foram representados em médias  $\pm$  DP de experimentos realizados em triplicata. \*Estatisticamente diferente dos valores do controle,  $p < 0,001$  (ANOVA).

## Conclusão

A 6-OHDA induz a translocação da cofilina para a mitocôndria e o consequente colapso do potencial de membrana das mitocôndrias. Ainda células que superexpressam cofilina tornam-se mais sensíveis a 6-OHDA. Dessa forma a cofilina possui um papel importante na morte celular causada pela 6-OHDA.

## Agradecimentos / Apoio Financeiro